

Aus dem Institut für Tieranatomie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

IMMUNZYTOCHEMISCHE UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE  
UNTERSUCHUNGEN AM BOVINEN EILEITER IN EINER  
DREIDIMENSIONALEN ORGANKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Svetla Kotov  
aus Sofia

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.- Prof. Dr. Sinowatz
Korreferent:	Univ.- Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

FÜR MEINE FAMILIE

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Eileiter</b>	<b>11</b>
2.1.1	Entwicklung	11
2.1.2	Makroskopische und mikroskopische Anatomie	12
2.1.3	Ultrastruktureller Aufbau des Eileiterepithels	14
2.1.4	Physiologie und Sexualzyklus	20
2.1.5	Oviduktflüssigkeit	21
2.1.6	Hormonelle Regulation	24
2.1.7	Funktion der Eileiter	26
2.1.8	Kapazitation der Spermien	28
<b>2.2</b>	<b>Eileiterepithelzellkulturen</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Dreidimensionale Organkulturen</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Gewebeentnahme</b>	<b>33</b>
3.1.1	Entnahme und Präparation der Gewebeproben	33
<b>3.2</b>	<b>Lichtmikroskopie</b>	<b>34</b>
3.2.1	Fixierung und Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie	34
3.2.2	Histologische Übersichtsfärbungen	34
3.2.3	Immunhistochemische Untersuchungen	36
3.2.4	Auswertung	40
<b>3.3</b>	<b>Gewebekultur</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Transmissions-Elektronenmikroskopie</b>	<b>42</b>
3.4.1	Probenaufbereitung	42
3.4.2	Immersionsfixierung	42
<b>3.5</b>	<b>Gewinnung und Auswertung morphometrischer Daten</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Glykohistochemische Untersuchungen</b>	<b>43</b>
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Lektinbindungsstellen in 3D Organkulturen des bovinen Eileiters	43



<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Histomorphologie</b>	<b>46</b>
4.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	46
4.1.2	PAS-Färbung	66
4.1.3	Trichromfärbung nach Masson und Goldner	68
4.1.4	Silberimprägnierung nach Gomori	70
4.1.5	Alcianblau-Färbung	72
<b>4.2</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen am Eileiter des Rindes</b>	<b>74</b>
4.2.1	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors (ER)	74
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR)	80
4.2.3	Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP)	87
4.2.4	Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP)	92
<b>4.3</b>	<b>Elektronenmikroskopische Untersuchungen</b>	<b>97</b>
<b>4.4</b>	<b>Glykohistochemische Untersuchungen am bovinen Eileiter</b>	<b>128</b>
4.4.1	Bindungsstellen für Canavalia ensiformis Agglutinin (Con A)	128
4.4.2	Bindungsstellen für Pisum sativum Agglutinin (PSA)	130
4.4.3	Bindungsstellen für Ulex europaeus Agglutinin (UEA)	132
4.4.4	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin (WGA)	134
4.4.5	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin (succinyliert) (WGAs)	136
4.4.6	Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	138
4.4.7	Bindungsstellen für Ricinus communis Agglutinin (RCA)	140
4.4.8	Bindungsstellen für Arachis hypogaea Agglutinin (PNA)	142
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>158</b>

<b>8</b>	<b>VERZEICHNISSE</b>	<b>159</b>
<b>8.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>8.3</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen</b>	<b>176</b>
<b>8.4</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>176</b>
<b>8.5</b>	<b>Verzeichnis der Graphiken</b>	<b>179</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>180</b>
<b>9.1</b>	<b>Lösungen</b>	<b>180</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>189</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>190</b>

## 1 Einleitung

Der Eileiter bietet eine optimale Umgebung für die Befruchtung und die danach folgende frühe embryonale Entwicklung. Frühe Embryonen erhalten dabei Signale von Zellen des Eileiters, welche die Genexpression im Embryo beeinflussen. Es ist technisch sehr schwierig, die frühe embryonale Entwicklung und embryo-maternale Kommunikation in vivo zu untersuchen. In vitro Methoden erlauben dagegen, bestimmte Aspekte der Wechselwirkungen zwischen Embryo und Eileiter genauer zu studieren. So werden z.B. Eileiterzellkulturen genutzt, um die Kulturbedingungen für in vitro produzierte Embryonen zu optimieren.

In kurzzeitigen Suspensionskulturen von bovinen Oviduktepithelzellen (BOEC) wurde gezeigt, dass die Struktur und Funktion von bovinen Eileiterepithelzellen für 12-24 Stunden gut erhalten bleibt. Da die Verweildauer des Embryos im Eileiter in vivo 2,5-3 Tage beträgt, erscheint es sinnvoll, Kulturbedingungen so einzustellen, dass die Morphologie und Funktion der BOEC für mindestens 2,5-3 Tage weitgehend normal erhalten bleibt.

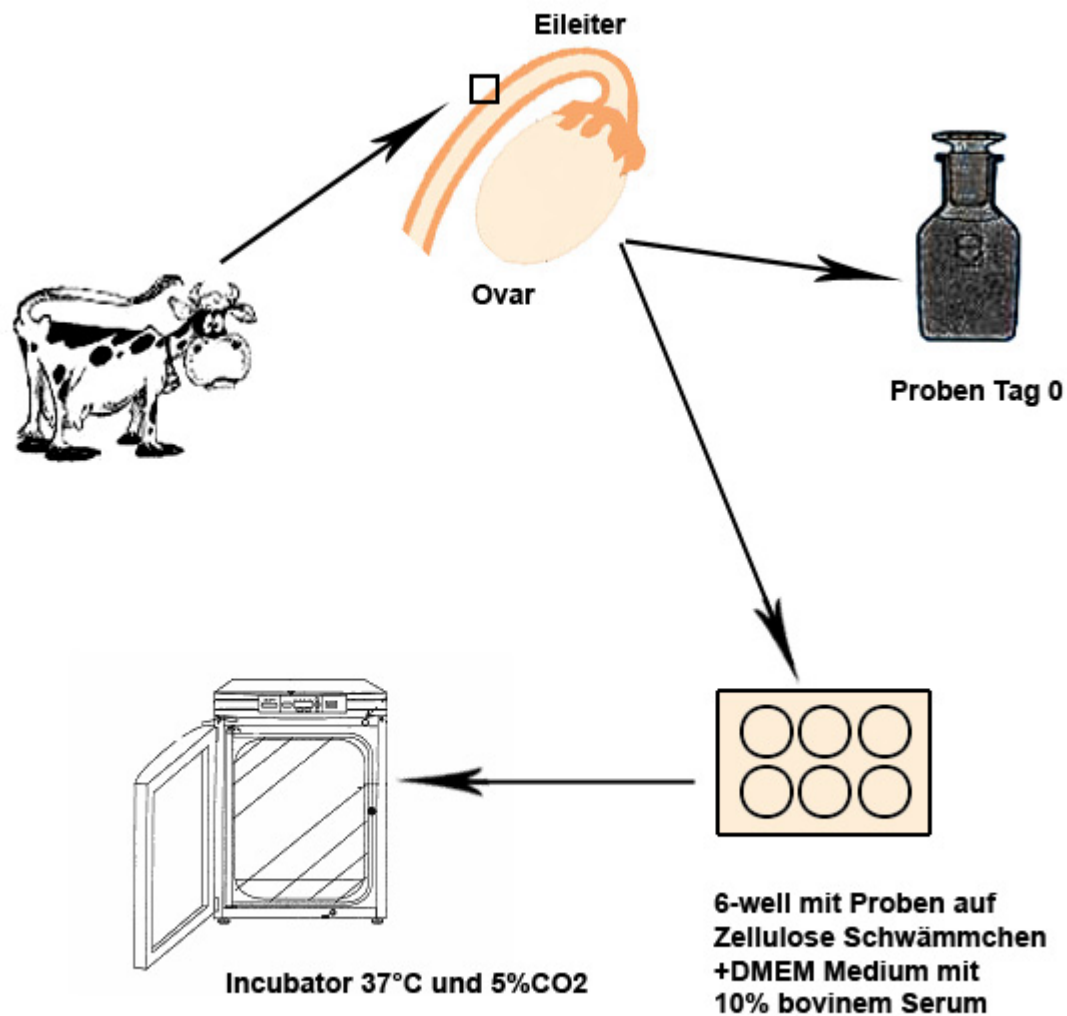
Das Ziel meiner Arbeit war es, eine dreidimensionale Organkultur von Eileiterepithelgeweben zu etablieren, die sich für die Ko-Kultur mit frühen bovinen Embryonen eignet und die dabei auftretenden Veränderungen des kultivierten Eileiterepithels mit hochauflösenden morphologischen Techniken (konfokale Mikroskopie, TEM) untersucht.

Dabei wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

1. "Proof of Principle" Experimente
2. Erhaltung der Zell- und Gewebearchitektur des Eileiters über 7 Tage (Vergleich der histomorphologischen Merkmale der kultivierten Eileiterproben mit dem Ausgangsmaterial am Tag 0)
3. Erhaltung der Zellmerkmale und -eigenschaften über 7 Tage (Lokalisation der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron oviduktaler Glykoproteine (OGP) und „Uterine Milk Protein“ (UTMP) im kultivierten Material und im Ausgangsmaterial am Tag 0)
4. Etablierung einer Zellkultur, die als Ko-Kultur für zukünftige Studien geeignet ist.

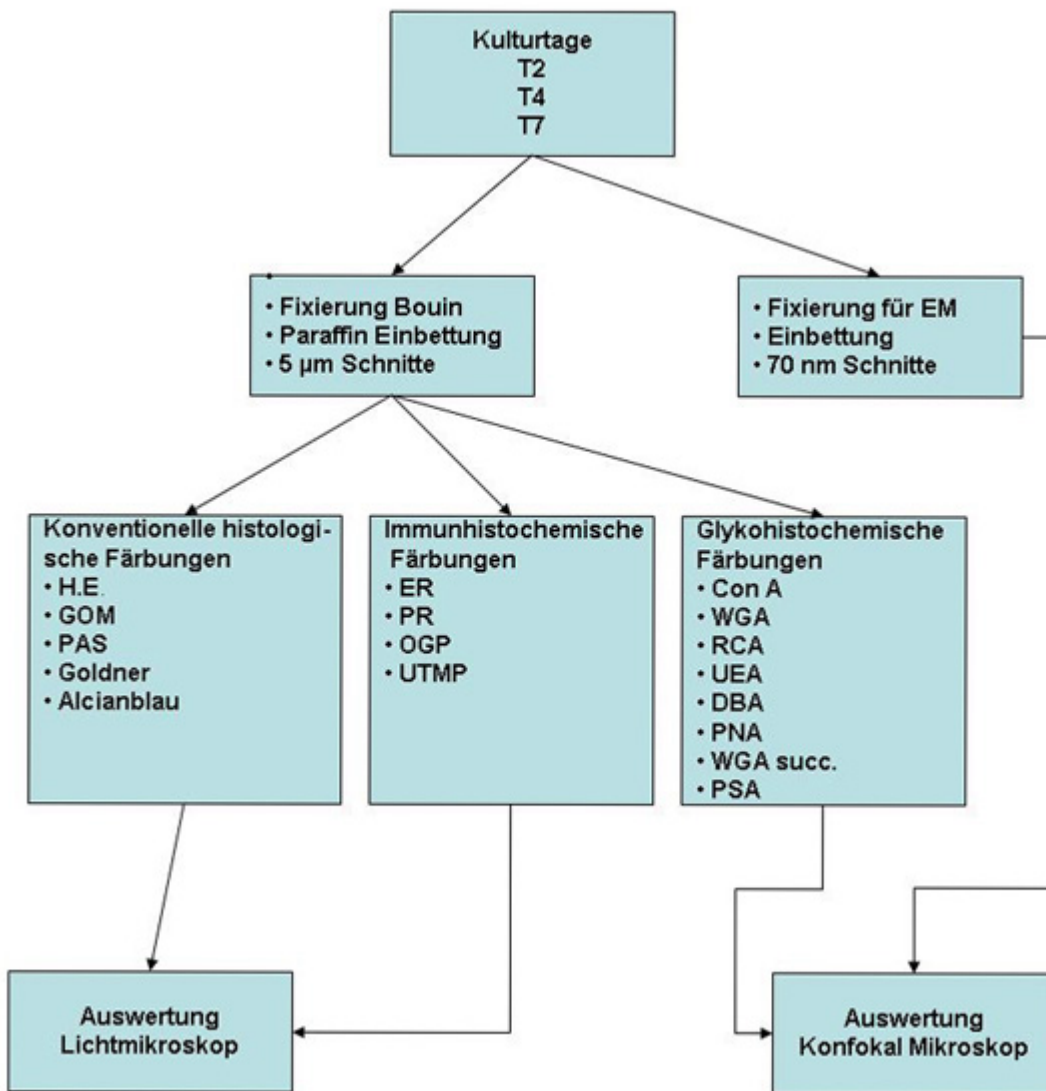
Diese Arbeit dient als Basis für die Entwicklung eines Modellsystems für weitere Studien zur embryonalen Frühentwicklung und für die embryo-maternale Kommunikation.

**Abb. 1** Experimentelle Ansätze, mit deren Hilfe die oben genannten Ziele verfolgt wurden



#### Versuchsaufbau

1. Sammeln von Ausgangsmaterialien
2. Präparation des Eileitergewebes für die Organkultur
3. Kultivierung der Proben über 2, 4 und 7 Tage
4. Untersuchung der Proben am Tag 0, Tag 2, Tag 4, und Tag 7 mittels konventioneller morphologischer Methoden; Immunhistochemische und glykohistochemische Färbungen, elektronenmikroskopische Untersuchungen



**Abb. 2** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Abkürzungen: H.E.: Hämalaun-Eosin-Färbung; GOM: Silberimprägnation nach Gomori; PAS: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion; Goldner: Trichromfärbung nach Masson und Goldner; Alc.blau: Alcianblau Färbung; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; OGP: Oviduktspezifisches Glykoprotein; UTMP: „Uterine Milk Protein“; ConA: Canavalia ensiforme Agglutinin; WGA: Triticum vulgare Agglutinin; RCA: Ricinus communis Agglutinin; UEA: Ulex europaeus Agglutinin; DBA: Dolichus biflorus Agglutinin; PNA: Arachis hypogaea Agglutinin; WGA succ.: Wheat germ Agglutinin succinyliert; PSA: Pisum sativum Agglutinin

## **2 Literatur**

### **2.1 Der Eileiter**

#### **2.1.1 Entwicklung**

Der Geschlechtsapparat weist bei beiden Geschlechtern zunächst eine indifferente Anlage auf. Aus der Keimleiste gehen die Keimdrüsen und ihr Aufhängeapparat hervor (Jost et al. 1973). Erst mit der fortschreitenden Entwicklung erfolgt die Differenzierung zum Hoden bzw. zum Ovar (Michel, 2001). Bei Säugetieren entwickeln sich die ableitenden Geschlechtsgänge aus zwei unterschiedlichen Gangsystemen, dem Urnierengang (Wolff Gang, Ductus mesonephricus) und dem Müller Gang (Ductus paramesonephricus). Im indifferenten Stadium der Genitalentwicklung sind sowohl beim weiblichen als auch beim männlichen Geschlecht beide Gangsysteme angelegt (Price und Zaaij, 1969). Während dieser Zeit wachsen die Müller Gänge bei beiden Geschlechtern am Wolff Gang entlang nach kaudal und münden in den Sinus urogenitalis. Die embryonale Entwicklung der beiden Gangsysteme verläuft immer in sehr engem Kontakt mit der Urniere. Durch die Ausbildung der beiden Geschlechtsgänge und die Rückbildung der Urniere entsteht das faltenartige Gekröse dieser Gänge. Es wird in seiner Gesamtheit als Geschlechtsgangfalte bezeichnet. Der Wolff Gang gilt als exkretorischer Gang des Mesonephros und entsteht zuerst (Moritz und Wintour, 1999). Der Müller Gang entsteht als eine Verdickung und Einsenkung des Coelomepithels (Trichterfeld). Es bildet sich zunächst eine solide Trichterspitze an der lateralen Seite des Mesonephros, aus der dann der Müller Gang nach kaudal wächst. Beide Gänge verlaufen im lateroventralen Bereich der Urniere. Der Müller Gang begleitet den Urnierengang zunächst lateral. Am kaudalen Urnierenpool kreuzen sich beide Gänge. Die nun medial liegenden Müller Gänge fusionieren. Sowohl die nun ein Rohr bildenden Müller Gänge als auch die beiden Wolff Gänge münden im Sinus urogenitalis (Jost et al., 1973). Beim weiblichen Tier entsteht aus dem kranialen Teil des Müller Ganges der Eileiter, aus den restlichen Anteilen die Gebärmutter (Uterus) und der obere Anteil der Scheide (Vagina). Es wird angenommen, dass sich der Uterus ab der Kreuzungsstelle der Müller Gänge mit den Wolff Gängen entwickelt. Die Verschmelzung der beiden Müller Gänge beginnt beim Rind mit der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) 71 cm (Rüsse und Sinowatz, 2002).

Bei der männlichen Sexualdifferenzierung wird von den Sertoli-Zellen der fetalen Hoden das Anti-Müller-Hormon (AMH) gebildet. Dabei handelt es sich um ein Proteohormon, das die Rückbildung der Müller Gänge bewirkt und so die Ausbildung eines weiblichen Genitaltrakts

verhindert (Whitworth et al., 1997). Fehlt es oder wird seine Bindung an den entsprechenden Rezeptor verhindert, kommt es neben der Entwicklung typisch männlicher Sexualmerkmale gleichzeitig zur Ausbildung von Strukturen, die bei der weiblichen Sexualdifferenzierung aus dem Müller-Gang entstehen. Dies wird als Müller-Gang-Persistenzsyndrom bezeichnet (Pelliniemi und Saloniemi, 1976).

Der kraniale Teil des Wolff Ganges bildet durch sein schnelles Längenwachstum zahlreiche Schlingen und wandelt sich zum Nebenhodenkanal um. In diesen münden die aus der Urniere hervorgehenden Ductuli efferentes. Aus dem gestreckten kaudalen Teil gehen Teile des Ductus deferens hervor (Jost et al., 1973).

### 2.1.2 Makroskopische und mikroskopische Anatomie

Der Eileiter vermittelt die Verbindung zwischen dem Ovar und den Uterus (Eddy und Pauerstein 1980). Die Länge des Eileiters beträgt beim Rind 20-28 cm (Nickel et al., 1987). Er ist mit der Mesosalpinx am Eierstock befestigt. Zwischen dem Mesovar und der Mesosalpinx ist ein von kranioventral zugänglicher Raum, die Eierstocktasche (Bursa ovarica), ausgebildet (Koch und Berg, 1985). Auf Grund von morphologischen und anatomischen Unterschieden kann der Eileiter in vier Segmente unterteilt werden: Infundibulum, Ampulla, Isthmus und Pars uterina tubae (auch uterotubaler Übergang, UTJ). Das nahe am Eierstock befindliche Ende des Eileiters besteht aus einem Trichter (Infundibulum) mit 1-2 cm langen Fransen (Fimbriae), von denen eine als Fimbria ovarica dem Eierstock anliegt (Lombard et al., 1950; Nickel et al., 1987). Diese Verbindung ist von großer Bedeutung für den normalen Mechanismus des Abtransports der Oozyte nach der Ovulation (Eddy und Pauerstein, 1980). Das Infundibulum geht in die Ampulla tubae uterinae über, dem längsten Abschnitt des Eileiters. Sie umfasst zwei Drittel der gesamten Länge des Eileiters. Hier findet die Kapazitation der Spermien und die Befruchtung statt. Als drittes Segment schließt sich der Isthmus an. Er hat das kleinste Lumen und dient als Spermienreservoir (Pauerstein und Woodruff, 1967; Suarez, 2002). Die Pars uterina tubae (UTJ) stellt die Verbindung zwischen Eileiter und Uterus her (Leese, 1988).

Histologisch lassen sich am Querschnitt des Eileiters folgende Schichten unterscheiden: Tunica mucosa, die sich aus Lamina epithelialis mucosae und Lamina propria mucosae zusammensetzt. Die nächste Schicht ist die Tunica muscularis gefolgt von der Tunica serosa mit Tela subserosa, die glatte Muskelfasern, Blutgefäße und Nerven enthält.



Die Tunica muscularis beinhaltet die eileitereigene Muskulatur aus glatten Muskelzellen, die zwei gegenläufige, sich durchflechtende Spiralsysteme bilden. Innen und außen ist der Faserverlauf longitudinal. In der Mitte der Tunica muscularis liegt eine zirkuläre Schicht vor, was dadurch deutlich wird, dass die Lage der Kerne nur einen geringen Steigungswinkel aufweist. Die Stärke der Tunica muscularis, insbesondere ihre innere Längsmuskellage, nimmt von der Pars uteri, wo sie stark ausgebildet ist, in Richtung Ampulla ab. Schließlich ist sie nur noch mit einzelnen Fasern an der Basis der Falten vertreten (Hees und Sinowatz, 1992). Es ziehen keine glatten Muskelzellen in die Schleimhautfalten (Lombard et al., 1950).

Die glatte Muskulatur ist stark von Bindegewebe durchzogen, welches viele, auch größere Blutgefäße führt (Hees und Sinowatz, 1992) und zudem elastische sowie retikuläre Fasern enthält (Lombard et al., 1950). Die peristaltische Kontraktion der Eileitermuskulatur unterstützt den Transport des Eileiterinhalts zum Uterus.

Die Tunica mucosa ist die innerste Schicht. Sie besteht aus einer Bindegewebsschicht (Lamina propria mucosae), welche das Grundgerüst für die Epithelfalten bildet und dem einschichtigen hochprismatischen Epithel (Lamina epithelialis mucosae) (Lombard et al., 1950; Pauerstein und Woodruff, 1967; Ellington, 1991; Liebich, 2004).

#### *2.1.2.1 Epithel des Eileiters*

Das Epithel des Eileiters (Lamina epithelialis mucosae) kleidet das Eileiterlumen aus. Es setzt sich im Wesentlichen aus zwei Zellarten zusammen: sekretorische Zellen und Zilienzellen (Flimmerzellen). Die Flimmerzellen besitzen auf ihrer apikalen Oberfläche 3-20 µm lange, bewegliche Zellfortsätze (Kinozilien). Die Kinozilien nehmen ihren Ursprung an den Basalkörperchen und zeigen eine (9x2)+2 Struktur, das heißt (d.h.) zwei zentrale Mikrotubuli werden ringförmig von 9 Paar peripheren Mikrotubuli umgeben. Die Zilien schlagen synchron in Richtung Uterus und unterstützen so einen gerichteten Fluss der Eileiterflüssigkeit (Abe und Hoshi, 1997). Im Gegensatz dazu besitzen die sekretorischen Zellen Mikrovilli, die fingerförmige, 1-2 µm lange Ausstülpungen der Zellmembran (Bjorkman und Fredricsson, 1961) sind. Die sekretorischen Zellen sezernieren Substanzen mit embryotropher Wirkung, die besonders wichtig für die frühembryonale Entwicklung und die embryo-maternale Kommunikation sein dürften.

Die Zahl der Zilien nimmt kontinuierlich vom abdominalen Ende des Eileiter zum Isthmus hin ab. Im Eileiterepithel lassen sich deutlich ausgeprägte zyklische Veränderungen feststellen. Nach Meinung einiger Autoren vermindert sich der prozentuale Anteil der Zilienzellen im Infundibulum und der Ampulla signifikant während der Lutealphase im Vergleich zur folliculären Phase (Yaniz et al., 2000; Lücke, 2005).

Zahlreiche Sekretgranula in den sekretorischen Zellen führen zur Vorwölbung der apikalen Zellabschnitte ins Lumen. Da die Sekretion in der Gelbkörperphase weitaus am stärksten ist, erscheint während dieses Zyklusabschnittes das Epithel deutlich höher.

In der Literatur werden zusätzlich noch zwei weitere Zelltypen im Epithel des Eileiters beschrieben. Schmale Zellen mit stiftchenförmigem Kern, die sich trichterförmig zum Lumen verbreitern, werden Stiftchenzellen („peg cell“) genannt (McDaniel et al., 1968). Nach heutigen Erkenntnissen handelt es sich dabei um degenerierte Epithelzellen, die vom Epithel abgestoßen werden.

Die zweite Zellart sind kleine, runde Zellen mit wenig Zytoplasma, die sich meistens in der Nähe der Basallamina befinden (Abughrien et al., 2000). Diese Zellen teilen sich nicht und exprimieren kein Zytokeratin und S-100 (Walter und Miller, 1996). Mittels CD3-Antikörper konnten die basalen Zellen im Eileiter als T-Lymphozyten identifiziert werden (Comer et al., 1998).

### 2.1.3 Ultrastruktureller Aufbau des Eileiterepithels

Das bovine Epithel ist einschichtig hochprismatisch. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen haben ungefähr die gleiche Größe und äußere Form. Sie sitzen auf einer gut ausgebildeten Basalmembran (Bjorkman und Fredricsson, 1961).

Die Zellmembran zwischen benachbarten Zilienzellen verläuft hauptsächlich gerade. Im Vergleich dazu haben die sekretorischen Zellen eine gewellte Membran.

Die Epithelzellen sind durch verschiedene Zellverbindungen miteinander verbunden. Die Zonulae occludentes oder „tight junctions“ befinden sich unmittelbar unter der freien Oberfläche des Epithels. Hier verschmelzen die Membranen benachbarter Zellen miteinander. Der Fusionsbereich der „tight junctions“ erstreckt sich über die ganze Zirkumferenz der Zelle (Geneser, 1990).

Die „tight junctions“ versiegeln den Interzellularraum nahe der Epitheloberfläche gegen das Lumen. Sie versperren den interzellulären Weg für den Durchtritt von Substanzen, haben auch eine mechanische Funktion und dienen als eine besonders feste Verbindung zwischen den Zellen.

An die „tight junctions“ schließen sich die Zonulae adhaerentes an. Hier verlaufen die Membranen der benachbarten Zellen parallel in einem Abstand von circa 20 nm zueinander. Eine weitere Art der Zwischenzellverbindungen sind die Desmosomen. Der Intrazellularraum beträgt hier 30 nm. Die Zellmembranen haben im Bereich der Desmosomen auf der jeweiligen Zytoplasmaseite Haftplatten aus elektronendichtem Material. Zu diesen ziehen zytoplasmatische Intermediärfilamente (Tonofilamente). Die Desmosomen haben die Funktion, Scherkräfte und Zug gleichmäßig über das Epithel zu verteilen (Bjorkman und Fredricsson, 1961; Geneser, 1990).

Die „gap junctions“ sind kommunizierende Verbindungen der Zellen, die die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen durch kanalbildende Proteinkomplexe, den sogenannten Tunnelproteinen (Connexon), verbindet. Durch die „gap junctions“ können Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 Dalton passieren. Anorganische Ionen, Zucker, Aminosäuren, Nucleotide und Vitamine werden so ausgetauscht und elektrische Signale übertragen, während Makromoleküle wie Proteine, Nucleinsäuren und Polysaccharide nicht passieren können (Geneser, 1990).

Die Zilienzellen werden nach ihrer Oberflächenstruktur in Kinozilien und Mikrovilli unterteilt. Die Zilien konzentrieren sich eher in der Mitte der Zelloberfläche und sind aktiv beweglich (Hees und Sinowatz, 1992). Ihre Zahl wird zur Peripherie hin geringer (Bjorkman und Fredricsson, 1960). Zilien besitzen die typische  $(9 \times 2) + 2$  Mikrotubulianordnung und eine Basalkörperchenstruktur mit langen, geriffelten Wurzelfüßchen, die bis tief ins apikale Zytoplasma reichen (Verhage et al., 1979). Die Zellkerne der Zilienzellen befinden sich im apikalen Drittel der Zelle (Bjorkman und Fredricsson, 1961). Sie haben eine ovale Form, große Nucleoli und eine glatte Kernmembran. Die Zilienzellen haben zahlreiche Mitochondrien (Ellington, 1991), besonders im supranukleären Bereich. Sie können eine beträchtliche Länge aufweisen und ordnen sich parallel zur Längsachse der Zelle an (Bjorkman und Fredricsson, 1961).

Der Golgi-Apparat der Zilienzellen ist supranuklear lokalisiert. Er besteht aus Stapeln von Zisternen und Vesikeln in verschiedenen Größen. In der Nähe des Golgi-Apparates finden

sich ovale Körperchen mit einer hohen Dichte und einer unregelmäßigen inneren Struktur. Die ovalen Körperchen ähneln Lysosomen und wurden einzeln oder in Aggregaten relativ nah am Nukleus beobachtet.

Das endoplasmatische Retikulum der Zilienzellen ist unauffällig. Es besitzt sehr nah aneinander liegende Zisternen. Freie Ribosomen wurden in kleinen Gruppen beobachtet.

Die Ultrastruktur der Zilienzellen ändert sich während des Zyklus nur wenig (Bjorkman und Fredricsson, 1961).

### Ziliogenese

Die Ziliogenese in den Zilienzellen des Eileiters wurde in verschiedenen Spezies und beim Menschen untersucht (Anderson und Brenner, 1971; Dirksen, 1971; Hagiwara et al., 1992). Bei der Differenzierung der Zilienzellen geht die Ausbildung der Basalkörperchen der Ausbildung der Zilien voraus. Basalkörperchen werden auf zwei Wegen gebildet, azentriolär und zentriolär. Die zentrioläre Bildung wird selten beobachtet (Anderson und Brenner, 1971; Hagiwara et al., 1992; Abughrien und Dore, 2000).

Beim azentriolären Weg werden die Basalkörperchen von fibrogranulären Vorläuferzellen neu synthetisiert, die sich vereinigen und zu Zentren organisieren, die Deuterosomen genannt werden (Abughrien und Dore, 2000).

Anderson und Brenner (1971) haben im bovinen Oviduct kleine, unregelmäßig geformte Granula entdeckt, die sie als fibröse Granula bezeichnet haben. Diese Granula haben eine Größe von circa 50-80 nm. Sie kommen meistens im apikalen Zytoplasma vor. Es werden selten einzelne Granula beobachtet, meistens liegen sie in Gruppen zusammen. Die fibröse Granula formieren sich zu runden oder ovalen Körperchen. Sie werden vom Zytoplasma durch keine eigene Membran abgegrenzt. Sie bestehen aus elektronendichter Granula, die in eine homogene Matrix eingebettet sind. Ähnliche Granula haben auch Nayak und Ellington (1977) in der Zilienzellen des Eileiters beim Rind, Anderson und Brenner, (1971) bei Rhesus Affen und Sorokin, (1968) bei der Ratte beobachtet.

Die Herkunft der fibrösen Granula wird immer noch kontrovers diskutiert. Manche Autoren nehmen an, dass sie sich vom Golgi-Apparat herleiten (Sorokin, 1968; Hagiwara et al., 1992), andere vermuten eine Bildung im endoplasmatischen Retikulum (Dirksen, 1971).

In der Nähe solcher Granula werden auch reichlich freie Ribosomen beobachtet. Sie beteiligen sich bei der Synthese von Proteinkomponenten der fibrösen Granula (Hagiwara et al., 1992; Abughrien und Dore, 2000).

Die Granula formieren sich zunächst zu sphärischen Strukturen und vereinigen sich dann zu größeren Untereinheiten, manche davon mit deutlich länglicher Form. Anschließend werden sie zu hohlen Sphären, Deuterosomen (Sorokin, 1968).

Die Struktur von Deuterosomen ist ähnlich wie die von den Aggregaten der fibrösen Granula, nur kompakter. Sie besitzen auch keine Membran gegenüber dem Zytoplasma und haben eine ringförmige Form (Sorokin, 1968; Anderson und Brenner, 1971). Die Deuterosomen können in zwei Typen unterteilt werden, nämlich in solide (Anderson und Brenner, 1971; Verhage et al., 1979) und sphärische (Sorokin, 1968; Dirksen, 1971) Deuterosomen. Die Deuterosomen dienen als Zentren für das Wachstum und die Organisation der Prozentriolen (Abughrien und Dore, 2000). Jedes Deuterosom wird von zwei bis sechs Prozentriolen umgeben. Diese entwickeln sich zu „Basalkörperchen“ und wandern an die Oberfläche der Zelle. Hier beginnen sie mit der Bildung von Zilien.

Die Prozentriolen stellen unreife Zentriolen dar. Aus dem mikrotubulären System der Prozentriolen entwickeln sich kurze, zylinderähnliche Strukturen (Anderson und Brenner, 1971; Hagiwara et al., 1992). Der Längsschnitt durch ein Prozentriol läßt eine parallele Streifung erkennen. Während der Ziliogenese werden in den Zellen neben Prozentriolen in verschiedenen Entwicklungsstadien, auch viele fibröse Granula in der supranukleären Region gefunden. Die Prozentriolen wachsen durch Polymerisierung von Tubulin an ihrem Ende. Sie bekommen die typische  $(9 \times 2) + 2$  Struktur. Die kompletten Zentriolen wandern zur Zelloberfläche und ordnen sich unter der apikalen Zellmembran als Basalkörperchen an. Diese bilden die Zilien in Richtung Lumen aus (Anderson und Brenner, 1971).

Dabei bildet sich ein Zytoplasmabläschen genau über der Spitze des Basalkörperchens aus und daraus entwickelt sich eine Zilienknospe. Ist die Zilie komplett ausgebildet, löst sich die Spitze der Knospe auf und die Zilie nimmt ihre endgültige konische Form an. Zu dieser Zeit bilden sich auch die Wurzelfüßchen der Basalkörperchen aus. Es wird vermutet, dass dabei die fibrösen Granula eine unterstützende Rolle spielen (Sorokin, 1968; Anderson und Brenner, 1971; Dirksen, 1971; Hagiwara et al., 1992).

Beim zentriolären Bildungsweg von Basalkörperchen und Zilien werden zunächst diplosomale Zentriolen ausgebildet, in deren Nachbarschaft dann die Prozentriolen entstehen. Hagiwara

et al. 1992 beschreiben die Bildung von Zilien auf dem zentriolären Weg bei der Ratte, wobei der Hauptanteil der Basalkörperchen durch eine sich wiederholende Eigen-replikation der Zentriolen gebildet wird.

Abughrien und Dore (2000) haben die Ziliogenese zwischen Tag 1-3 des Zyklus beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen am Eileiter während der folliculären Phase beim Menschen (Verhage et al., 1979; Hagiwara et al., 1992) und bei Rhesus Affen (Anderson und Brenner, 1971). Verschiedene Autoren fanden, dass die Ziliogenese durch Östrogene stimuliert wird (Brenner, 1969; Anderson und Brenner, 1971; Verhage et al., 1990).

Die sekretorischen Zellen weisen im Vergleich zu den zilientragenden Zellen ein deutlich elektronendichteres Zytoplasma auf. Sie besitzen viele Polyribosomen, welche ein Hinweis auf eine hohe Proteinbiosynthese in bestimmten Zyklusphasen sind (Bjorkman und Fredricsson, 1961). Die sekretorischen Zellen besitzen nur eine Art Oberflächenstruktur, nämlich Mikrovilli. Ihre Form und Anzahl ändert sich während des Zyklus (Bjorkman und Fredricsson, 1960).

Bage et al. (2002) sind der Meinung, dass die Mikrovilli der Oberflächenvergrößerung dienen. Dadurch wird eine verbesserte Resorption von oviduktaler Flüssigkeit erreicht. Nach wiederholter Trächtigkeit vermindert sich die Zahl der Mikrovilli bei Kühen im Vergleich zu Färsen. Deshalb sammelt sich bei diesen Kühen oviduktale Flüssigkeit im Lumen des Eileiters an (Bage et al., 2002).

Die sekretorischen Zellen bilden zyklusabhängig Protrusionen aus. Dabei wölbt sich das apikale Zytoplasma mehr oder weniger weit ins Eileiterlumen vor. Die Protrusionen können sowohl sekretorische Granula und Zellorganellen als auch Zellkerne enthalten. Sie sind oft nur über sehr schmale Zytoplasmabrücken mit dem Epithel verbunden (Eriksen et al., 1994; Lücke, 2005).

Die Zellkerne der sekretorischen Zellen befinden sich im basalen Drittel der Zelle. In den verschiedenen Zyklusstadien können sie auch in die Protrusionen verlagert werden (Bjorkman und Fredricsson, 1961). Diese Kerne zeigen oft aufgrund starker Einkerbungen der Kernmembran eine unregelmäßige Form (Eriksen et al., 1994).

Die sekretorischen Zellen haben ein stark ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (RER). Dieses ist dicht gepackt und ribosomenreich. Es befindet sich apikal oder supranukleär in der Zelle. Es besteht aus kurzen Zisternen und Vesikel. Im Metöstrus ist das RER oft weit dilatiert. Es enthält dann vermehrt osmiophobes, amorphes Material (Bjorkman und

Fredricsson, 1961; Eriksen et al., 1994). In den sekretorischen Zellen kommen wenige Mitochondrien vor. Sie befinden sich meist im apikalen Zytoplasma der Zelle und sind relativ groß (Eriksen et al., 1994). Die sekretorischen Zellen haben einen gut ausgebildeten Golgi-Komplex. Er liegt im supranukleären Zytoplasma, seltener auch apikal. Die Dictyosomen bestehen aus bis zu fünf glattwandigen, oft auch dilatierten Zisternen.

Die dritte Zellart im Eileiterepithel sind die Basalzellen. Das sind kleine, runde Zellen mit dunklem Kern und wenig Zytoplasma. Sie befinden sich basal im Epithel, in der Nähe der Basallamina, sind aber nicht mit ihr verankert und erreichen auch nicht die Oberfläche des Epithels. Sie kommen nicht so oft wie die Zilienzellen oder die sekretorischen Zellen vor und machen durchschnittlich nur circa 3,5% der Eileiterepithelzellen aus. Diese Zellart wurde in verschiedenen Spezies beschrieben: bei der Ratte (Bullon et al., 1980), Kaninchen (Fredricsson, 1959), Rind (Bjorkman und Fredricsson, 1961; Eriksen et al., 1994) und beim Menschen (Pauerstein und Woodruff, 1967).

Zellen mit ähnlichem Aussehen, die als Leukozyten- oder Lymphozyten- ähnliche Zellen bezeichnet wurden, werden bei Kaninchen (Odor, 1974), (Hollis et al., 1984), Rind (Lombard et al., 1950; McDaniel et al., 1968) beschrieben.

Andere Autoren vertreten die Hypothese, dass die Basalzellen Stammzellen sind und für die Erneuerung von Zilien- und sekretorischen Zellen verantwortlich sein könnten (Pauerstein und Woodruff, 1967; Bullon et al., 1980).

Abughrien et al. (2000) haben sich mit dem ultrastrukturellen Aufbau der Basalzellen beschäftigt und haben zwei Arten von Basalzellen identifiziert. Typ I-Zellen haben große Mengen an Heterochromatin in der Nähe der Kernmembran, aber auch im Zentrum des Kerns und zwar um die Nucleoli. Diese Zellen haben wenig Zytoplasma. Sie haben wenige Ribosomen, die einzeln oder in kleinen Aggregaten vorliegen können. Das wenige Zytoplasma erscheint wenig elektronendicht.

Die Zellen vom Typ II haben wenig Heterochromatin in der Peripherie des Zellkerns. Im Zytoplasma befinden sich unterschiedlich viele freie Ribosomen. Es wurden kurze, enge Cristae des RER beobachtet. Der Golgi-Apparat ist deutlich erhalten. Bei manchen Zellen wurden auch Lysosomen entdeckt. Die am häufigsten vorkommenden Organellen sind Mitochondrien. Diese haben eine runde oder leicht ovale Form.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen gelang es Abughrien et al. (2000) die Zellen von Typ I als Lymphozyten und die Zellen von Typ II als Makrophagen zu identifizieren. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (Nellor, 1965; Odor, 1974; Hollis et al., 1984).

#### 2.1.4 Physiologie und Sexulazyklus

Der Sexualzyklus des Rindes hat eine durchschnittliche Länge von 21 (17-24) Tagen (Rüsse und Sinowatz, 2002). Am Tag 17-18 steigt die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration an, was eine Luteolyse des Corpus luteum (C.L.) und einen Abfall der Progesteronkonzentration im Blut bewirkt. Mit der C.L.-Regression fängt der Proöstrus an. Er dauert 2-3 Tage. Währenddessen steigt die Konzentration von Östrogen, FSH und LH an (Wijayagunawardane et al., 1999). Der Beginn des Östrus wird als Tag 0 des Zyklus bezeichnet. Der Östrus hat eine relativ kurze Dauer von durchschnittlich 18 Stunden. FSH bewirkt in dieser Zeit eine vermehrte Blutzufuhr und Ödematisierung der weiblichen Geschlechtsorgane. Östrogen bewirkt eine vermehrte Sekretion im Eileiterepithel (Nayak und Ellington, 1977). Die sekretorischen Zellen in der Ampulla bilden Granula, welche in den ersten Tagen nach der Ovulation ins Lumen abgegeben werden. Die Epithelhöhe erreicht ihr Maximum (Lombard et al., 1950). Die Östrogenkonzentration nimmt dann langsam wieder ab. Die LH- und FSH-Konzentrationen steigen an, bis LH ein Maximum erreicht und die Ovulation ausgelöst wird. Der Follikel-sprung erfolgt 10-12 Stunden nach Ende der Brunst. Der die Eizelle umschließende Cumulus oophorus löst sich von der Follikelwand. Die Eizelle wird vom Infundibulum, das sich bei der Ovulation über das Ovar stülpt, aufgefangen und in die Ampulla transportiert (Blandau, 1969; Eddy und Pauerstein, 1980; Rüsse und Sinowatz, 2002). Damit findet die Ovulation am Tag 1 im Metöstrus statt. Im Eileiterepithel sind zahlreiche kernhaltige Protrusionen und Stiftchen-zellen zu finden.

Circa 4 Tage nach der Ovulation beginnt die Progesteronkonzentration im Blut auf messbare Werte anzusteigen. Damit wird der Diöstrus eingeleitet. Dieser dauert circa 14 Tage. Die Progesteronkonzentration ist bis zum Tag 17 hoch. Danach fällt sie ab und die Regression des C.L. beginnt (Rüsse und Sinowatz, 2002).



### 2.1.5 Oviductflüssigkeit

Die Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit wurde von zahlreichen Autoren untersucht (Miller und Schultz, 1987; Hunter, 1988; Leese, 1988; Nichol et al., 1992; Dickens et al., 1995). Sie ist im Vergleich zum Plasma reicher an  $K^+$  und  $HCO_3^-$ -Ionen. Die Konzentration der Nährstoffe unterscheidet sich ebenfalls im Vergleich zum Plasma.

Die Eileiterflüssigkeit hat keine gleichbleibende Zusammensetzung, sondern ändert sich während des Zykluses und der Gravidität (Hunter, 1998; Killian, 2004). Sie enthält Proteine, Hormone, Fette, Aminosäuren und Wachstumsfaktoren. Ein Teil der Eileiterflüssigkeit wird vom Epithel des Eileiters sezerniert.

Ein anderer Teil wird aus dem Blut ins Eileiterlumen transsudiert (Ellington, 1991; Nancarrow und Hill, 1994). Die Menge der Eileiterflüssigkeit, die während der verschiedenen Zyklusstadien gebildet wird, ist unterschiedlich. Während in der lutealen Phase nur circa 0,2 ml/d synthetisiert werden, steigt im Östrus ihre Menge auf das Zehnfache (circa 2 ml/d) an (Roberts et al., 1975). Hormonelle Veränderungen während des Zyklus beeinflussen die Produktion der Eileiterflüssigkeit. Durch die Gabe von Estradiol-17 $\beta$  kann die Bildung von Eileiterflüssigkeit erhöht, durch Progesteron erniedrigt werden (Leese et al., 2001).

Wie schon erwähnt, besteht die Oviduktflüssigkeit aus einem Transsudat des Plasmas (Hunter, 1988), dem die sekretorischen Eileiterepithelzellen bestimmte Proteine zusetzen (Malayer et al., 1988). Bei den vom Epithel sezernierten Proteinen kann zwischen eileiterspezifischen und -unspezifischen Proteinen unterschieden werden. Eileiterspezifische Glycoproteine wurden bei verschiedenen Spezies beschrieben (siehe Tab.1).

**Tab. 1 Ovidukt-spezifische Glykoproteine**

Autor	Jahr	Tierart	Titel
Kapur und Johnson Kapur und Johnson Kapur und Johnson	1985 1986 1988	Maus	An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes
Leveille et al. Oikawa et al. Abe et al. Abe et al.	1987 1988 1992 1993	Goldhamster	Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg Immunological characterization of oviductal glycoproteins associated with the zona pellucida of the golden hamster egg Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the oestrus cycle
Oliphant et al.	1984	Kaninchen	Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins
Sutton et al. Gandolfi et al. Murray	1994 1989 1992	Schaf	Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct
Buhi et al. McCauley et al.	1989 2003	Schwein	De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro

Malayer et al. Boice et al. Gerena und Killian Joshi	1988 1990 1990	Rind	Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow
Abe et al.	1995	Ziege	Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct
Boice et al. Verhage et al. Verhage et al.	1990 1990 1989	Baboon	Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons ( <i>Papio anubis</i> ) Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins Immunological characterization and immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the baboon ( <i>Papio anubis</i> )
Verhage et al. Wagh und Lippes Rapisarda et al.	1988 1989 1993	Mensch	The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct Human oviductal fluid proteins. III. Identification and partial purification Immunological characterization and immunocytochemical localization of an oviduct-specific glycoprotein in the human

Die Ovidukt-spezifischen Glykoproteine (OGP) haben ihre höchste Konzentration in der Präovulationsphase. Deren Synthese und Sekretion steht in Bezug zur Östrogenkonzentration (Buhi, 2002; Briton-Jones et al., 2004; Killian, 2004). Sun et al. (1997) behaupten allerdings, dass eher LH als Östrogen für die Stimulation und Sekretion von OGP verantwortlich ist. Obwohl OGP im Detail untersucht wurden, ist ihre Funktion nicht völlig klar. OGP binden z.B. an der Zona pellucida der Oozyte und am Embryo und spielen so möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Frühembryonalentwicklung (Verhage et al., 1997). Östrus-assoziierte OGP (OSGP) von verschiedenen Spezies zeigen eine starke Aminosäuresequenzhomologie.

Beim Hamster vermitteln die Kohlenhydratreste der Glykoproteine die Anhaftung der Spermien an das Epithel im Isthmus (DeMott et al., 1995). Abe und Hoshi (1997) berichten, dass

OSGP auch die Spermienkapazitation, die Bindung an die Zona pellucida und die Penetration der Spermien fördern (Martus et al., 1998).

Durch Erhöhung der Viskosität der Eileiterflüssigkeit spielt OGP eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Milieus im Eileiter, das den Embryo gegen osmotische Veränderungen in der Eileiterflüssigkeit schützt (Hunter, 1994).

### 2.1.6 Hormonelle Regulation

Steroidhormone sind kleine, relativ einfach gebaute Moleküle. Bei der Regulation der Eileiterfunktionen spielen Steroidhormone eine wichtige Rolle. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren wird in der Zelle eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die über die Aktivierung bestimmter Gensequenzen zur Transkription und Translation, und schließlich zur Synthese von spezifischen Proteinen führt (Meyer, 1994).

Eine Schlüsselrolle für die Eileiterfunktion haben Östrogene und Progesteron. Östrogene haben einen proliferativen Effekt auf die Epithelzellen des Eileiters, fördern seine Differenzierung und die Produktion von sekretorischen Granula in den sekretorischen Zellen (Abe et al., 1993a; Abughrien und Dore, 2000). Außerdem stimulieren sie im Epithel die Ziliogenese (Verhage et al., 1979; Donnez et al., 1985). Einen stimulierenden Effekt sollen Östrogene auch auf die Ausbildung der Zellorganellen haben (Nayak und Ellington, 1977).

Progesteron wirkt meistens antagonisierend auf die Effekte der Östrogene. Im uterinen Epithel hat es einen hemmenden Effekt auf die Proliferation der Epithelzellen (Kurita et al., 2000). Progesteron reduziert im Eileiter auch den Zilienschlag (Mahmood et al., 1998). Weiter verursachen hohe Konzentrationen von Progesteron im Blut einen Verlust der Zilien und eine Atrophie des Eileiterepithels (Verhage et al., 1979; Donnez et al., 1985).

Die Wirkungen der Östrogene und des Progesterons werden über spezifische Rezeptoren vermittelt (Couse et al., 1997). Diese Steroidhormonrezeptoren sind intrazelluläre Proteine, die als Informationsvermittler zwischen den Steroidhormonen und ihren Zielzellen bzw. Zielorganen dienen. Der entscheidende Schritt ist dabei die Aktivierung der Transkription durch Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an die DNA. Ein charakteristisches Merkmal der Steroidrezeptoren ist die Eigenschaft, das entsprechende Steroid mit hoher Spezifität und Affinität zu binden (Zachariah und Chakmakjian, 1983).

Lange Zeit war nur ein Östrogenrezeptor, nämlich Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) bekannt.

Vor einigen Jahren wurde noch ein zweiter Typ von Östrogenrezeptor, der Östrogenrezeptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) bei Ratte (Kuiper et al., 1996), Maus (Tremblay et al., 1997), Mensch (Mosselman et al., 1996), Rind (Rosenfeld et al., 1999) und Schwein (Kowalski et al., 2002) nachgewiesen.

Im Reproduktionssystem ist ER $\alpha$  der vorherrschende Subtyp. ER $\beta$  spielt in den meisten Teilen des weiblichen Reproduktionstraktes eine eher untergeordnete Rolle, mit Ausnahme von Ovar (Kuiper et al., 1997; Wang et al., 2000) und Milchdrüse (Saji et al., 2000), wo vor allem ER $\beta$  die Östrogenwirkung vermittelt. Im ER-Gehalt bestehen in den einzelnen Abschnitten des Eileiters deutliche Unterschiede: Die Expression von ER $\alpha$  ist in der Ampulla deutlich stärker als im Isthmus. Bei einer Erhöhung des Progesteronspiegels ins periphere Blut während der lutealen Phase erhöht sich auch die Expression von ER $\beta$  im Eileiter. Mit in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von Progesteron die Expression von ER $\beta$  erhöht wird. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der ER $\beta$ -Expression von Progesteron hin (Ulbrich et al., 2003). Die Expression von ER $\alpha$  steigt dagegen bei einer Zugabe von Östrogen an. ER $\beta$  wird im Isthmus stärker als in der Ampulla exprimiert. Die Tatsache, dass ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf verschiedene Weise reguliert werden, hängt wahrscheinlich mit ihren unterschiedlichen physiologischen Funktionen zusammen (Mowa und Iwanaga, 2000, Ulbrich et al., 2003). Während der follikulären Phase wird eine deutlich erhöhte Progesteronexpression im bovinen Eileiterepithel gemessen. Auch bei in vitro Untersuchungen wurde nach einer Zugabe von Östrogen eine erhöhte Expression der mRNA von PR festgestellt. Eine Zugabe von Progesteron reduziert dagegen die Transkription von PR. Dies weist auf eine Suppression der oviductalen PR-Expression während der progesterondominierten späten lutealen Phase hin (Ulbrich et al., 2003).

Siiteri et. al. konnten 1976 zeigen, dass Progesteron für die Erhaltung der Trächtigkeit verantwortlich ist. Ihre Hypothese besagt, dass Progesteron den Embryo vor dem Angriff des mütterlichen Immunsystems durch eine Hemmung der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion schützt. Heute ist gesichert, dass zur Erhaltung einer Trächtigkeit ein enges Zusammenspiel zwischen dem mütterlichen Immunsystem und dem Trophoblast erforderlich ist.

Zudem spielt Progesteron eine sehr wichtige Rolle während der Gravidität, da Progesteron als wichtigstes, die Trächtigkeit erhaltendes Hormon bei allen Säugetieren gilt und Progesteron die Abstoßungsreaktionen im Uterus gegen den sich entwickelnden Embryo unterdrückt (Hansen, 1998).

Die Wirkung von Progesteron wurde vor allem beim Schaf intensiv untersucht. Beim Schaf ist das Corpus luteum vor dem Tag 50 der Trächtigkeit die Hauptquelle des Progesterons. Seine vorzeitige Rückbildung führt zu einer Unterbrechung der Gravidität (Casida und Warwick, 1945). Ab Tag 50 übernimmt die Plazenta die Produktion von Progesteron, welches für die Erhaltung der Trächtigkeit weiterhin wichtig ist (Bauer und Gorell, 1980). Die inhibitorische Wirkung von Progesteron auf die Lymphozytenproliferation dürfte über einen rezeptorunabhängigen Mechanismus ablaufen (Sandermann, 1978; Gagne et al., 1980), wobei das Progesteron aus dem Corpus luteum allein im ersten Teil der Trächtigkeit nicht für eine Hemmung der Immunreaktion ausreicht (Hansen, 1998).

Die Synthese von Progesteronrezeptoren während der Frühgravidität wird durch bestimmte Proteine, z.B. über UTMP, stimuliert. „Uterine Milk protein“ (UTMP) hat auch eine hemmende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation. Es wird von Uterindrüsen und vom Oberflächenepithel des Uterus produziert und in die Uterinflüssigkeit abgegeben. Dieses Protein gehört zur Serpin-Familie der Proteasehemmer. Während der Trächtigkeit ist UTMP das dominierende Protein in der Uterinflüssigkeit. Seine Genexpression wird durch Progesteron kontrolliert (Hansen et al., 1986; Stephenson et al., 1989). Eine längere Progesteronstimulierung erhöht die UTMP Sekretion (Leslie und Hansen, 1991).

### 2.1.7 Funktion der Eileiter

Wenn ein Follikel im Ovar zum Graaf-Follikel herangereift ist, weisen die Fimbrien des Infundibulums rhythmische Bewegungen auf. Gleichzeitig bewegt sich das Ovar mittels der in seinem Bandapparat befindlichen glatten Muskelzellen etwas auf und ab und dreht sich, bis die Fimbria ovarica durch chemotaktische Einflüsse über den reifen Follikel zu liegen kommt (Eddy und Pauerstein, 1980). Der Transport der Eizelle nach ihrer Ausstoßung aus dem Graaf Follikel erfolgt vor allem durch Muskelkontraktionen der Tube, die einen Sog erzeugen und einen durch Kinozilien bewirkten Flüssigkeitsstrom, der in Richtung Uterus gerichtet ist.

Der Transport der Eizelle zum Ort der Befruchtung (Übergang von der Ampulla zum Isthmus) dauert beim Rind länger als bei anderen Spezies, nämlich circa 8-10 Stunden (Hunter, 1988; Ellington, 1991). Die Eizelle ist insgesamt nur 10-12 Stunden nach der Ovulation befruchtungsfähig (Hunter, 1988). Um die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung zu erhöhen, wird auch der Transport der Samenzellen Richtung Ampulla durch Kontraktionen der Eileitermuskulatur unterstützt. Beim Rind werden mit einem Ejakulat mehrere hundert Millionen Sper-

mien in die Vagina eingebracht. Nur ein kleiner Anteil von ihnen erreicht den Isthmus des Eileiters (Suarez et al., 1997) und nur einige hundert Samenzellen kommen in der Ampulla in die Nähe der Eizelle. Damit zum Zeitpunkt der Ovulation kapazitierte fertile Spermien am Ort der Befruchtung vorhanden sind, bildet der Eileiter im distalen Isthmus ein funktionelles Spermienreservoir aus (Suarez, 1998). Außer beim Rind wird ein Spermienreservoir auch beim Schwein (Hunter, 1981) und Schaf (Hunter und Nichol, 1983) beobachtet. In diesem Abschnitt des Ovidukts treten die Spermien in Kontakt mit den Epithelzellen des Eileiters. Sie binden sich vorübergehend an der Oberfläche der Epithelzellen. Die Reservoirbildung dient zum einem der Selektion der Spermien, zum anderen dem Erhalt der Vitalität und Fertilität der Spermien (Pollard et al., 1991). Auf der Oberfläche vom Eileiterepithel befinden sich Glykoproteine, die Fukose enthalten. Die Zelloberfläche der Spermien enthält Fukose-bindende Lektine. Dies wurde beim Wiederkäuer mit Hilfe histochemischer Untersuchungen, wie z.B. den Nachweis von UEA und LTA gezeigt. Diese Lektinfärbungen haben ergeben, dass Fukose auf der apikalen Oberfläche und den Zilien des Epithels von Isthmus und Ampulla des Rindes lokalisiert ist. Die Epithelzellen im Isthmus, die als Spermienreservoir dienen, enthalten eine besonders hohe Konzentration an Fukose (Lefebvre et al., 1997). Spermien des Rindes, die nicht im Spermienreservoir gebunden sind, erreichen sehr schnell die Ampulla. Rubenstein et al. (1951) berichten über Anwesenheit von Spermien in der Ampulla schon wenige Minuten nach der Insemination.

Nach der Befruchtung verweilt der Embryo circa 2,5-3 Tage am Übergang von der Ampulla zum Isthmus (El-Banna und Hafez, 1970). Frühe Rinderembryonen können sich nur im Eileiter und noch nicht im Uterus entwickeln (Newcomb und Rowson, 1975). Sie werden über die Eileiterflüssigkeit ernährt. Interessant ist dabei, dass die Glukosekonzentration im Eileiterlumen gegenüber der Serumglukosekonzentration stark vermindert ist. Glukose beeinträchtigt die Kapazitation der Spermien (Parrish et al., 1989) und hat zudem einen negativen Effekt auf die Entwicklung der frühen Embryonen. Dies konnte in In-vitro-Studien nachgewiesen werden (Ellington, 1991).

Zum Zeitpunkt der Ovulation hat die bovine Eizelle die erste Reifeteilung gerade abgeschlossen und beginnt die 2. Reifeteilung. In der Tube lösen sich die Cumuluszellen, die mit der Oozyte gemeinsam aus dem Follikel ausgestoßen wurden, von der Eizelle ab. Aus der befruchteten Eizelle, der Zygote, entsteht während des Transports im Eileiter durch Furchungsteilungen die Morula. Der Uterus wird meist im 12- bis 16-Zellen-Stadium erreicht.

### 2.1.8 Kapazitation der Spermien

Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ist ihre Kapazitation, Hyperaktivierung und Akrosomenreaktion. Das geschieht während dem Aufenthalt der Spermien im Eileiter. Kurz vor der Ovulation müssen sich die Spermien vom Spermienreservoir lösen um an den Ort der Befruchtung zu gelangen. Nur hyperaktivierte und kapazitierte Spermien können das Speicherreservoir verlassen. Während der Kapazitation vollziehen sich morphologische Veränderungen an der Oberfläche des Spermienkopfes, die verantwortlich für die Ablösung vom Eileiterepithel sind (Suarez, 2002). Hunter (2005) konnte zeigen, dass bei gleichzeitiger Freisetzung einer großen Zahl von Spermien aus dem Spermienreservoir die Polyspermie zunimmt. Damit ist die Reservoirbindung nicht nur für das Überleben der Spermien wichtig, sondern beugt auch einer Polyspermie vor.

Bei der Akrosomenreaktion, die durch Kontakt mit der Zona pellucida ausgelöst wird, verschmilzt die äußere Akrosomenmembran mit der Plasmamembran der Spermien. Es werden dann proteolytische Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt, die den Durchtritt der Spermien durch die Zona pellucida ermöglichen (Hunter, 1988)

## 2.2 Eileiterepithelzellkulturen

Zellkulturtechniken sind von Vorteil bei der Untersuchung von Prozessen und Strukturen, die in vivo schwierig zu studieren sind. Für den Eileiter ist das eine sehr gute Alternative, da dieses Organ nicht leicht für experimentelle Eingriffe erreichbar ist. Untersuchungen am Eileiter sind verbunden mit chirurgischen Eingriffen. Um dies zu vermeiden haben viele Autoren mit Eileiterepithelzellkulturen (Witkowska, 1979) von verschiedenen Spezies (Ouhibi et al., 1989), Mensch (Takeuchi et al., 1991) und Rind (Joshi, 1988; Joshi, 1995; Walter, 1995) gearbeitet.

Es existieren verschiedene Methoden, um Eileiterepithelzellen für eine Zellkultur zu isolieren. Die Zellen können mechanisch oder enzymatisch (durch Behandlung mit Kollagenase oder Trypsin) aus dem Gewebe isoliert werden. Manche Autoren bevorzugen die mechanische Isolierung und sind der Meinung, dass sie eine zuverlässige und kostengünstige Methode ist, bei welcher die Zellen geringeren Schaden als bei der enzymatische Isolierung nehmen (Walter, 1995; Sattar et al., 1999).



Takeuchi et al. (1991) haben auch die verschiedenen Methoden der Gewinnung von Epithelzellen aus dem Eileiter miteinander verglichen. Sie haben ein mechanisches Ausschaben am längs eröffneten Eileiters vorgenommen. Dabei erhielten sie eine stark mit Fibroblasten kontaminierte Kultur. Um die Reinheit der Eileiterepithelzellkultur zu erhöhen, stellten sie eine 30-minütige Inkubation mit 1% Kollagenase der Isolierung voran. Joshi (1995) benutzte auch eine enzymatische Isolierungsmethode. Er inkubierte die Zellen mit 0,1% Kollagenase für 90 min. bei 37°C und erreichte einen hohen Reinheitsgrad.

Für die Kultivierung der Zellen können verschiedene Gefäße oder Substrate benutzt werden, wie z.B. Plastik- oder Glasgefäße, Nylonmembranen oder Zellulosenitrat-Folien (Reischl et al., 1999). Die Zellanzüchtung wurde bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Takeuchi et al. (1991) und Joshi (1988; 1995) kultivierten ihre Zellen bei 37°C, andere wie Schmidt und Avery (1990) bei 39°C. Bei einem Vergleich dieser beiden Anzuchttemperaturen wurde gezeigt, dass die Temperatur keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellen hat (Thibodeaux et al., 1992; Walter, 1995). Einen Vorteil bringt die Kultivierung bei 39°C allerdings für Ko-Kulturexperimente mit Embryonen, welche diese Umgebungstemperatur benötigen, um sich entwickeln zu können.

Walter (1995) benutzte unbeschichtetes Glas, poröse Polycarbonat-Membranen (Transwell membrans) und kollagenbeschichtete Schälchen für ihre Untersuchungen. Sie berichtete über eine Konfluenz der Eileiterepithelzellen in der Kultur nach 7 Tagen.

Joshi (1995) kultivierte seine Zellen auf unbeschichteten und beschichteten (mit 10mg/ml und 2mg/ml Matrigel) Plastikgefäßen. Bei unbeschichteten Unterlagen wurde eine Konfluenz nach 10-15 Tagen erreicht.

Die Zellen auf mit Matrigel beschichteten Kulturgefäßen organisierten sich nach 8-10 Tagen zu Sphären und länglichen Tubuli. In der Zellkultur geht die ursprüngliche Morphologie der Zellen und ihre Ansprechbarkeit auf endokrine und parakrine Einflüsse rasch verloren.

#### Charakterisierung der kultivierten Eileiterepithelzellen

Epithelzellen aus dem Eileiter bilden nach 18-20 Stunden lange Zellkolonien. Die Zellen haben zu diesem Zeitpunkt noch die meisten Charakteristiken von hochprismatischen Zellen. Viele haben ihre Zilien behalten, und die Zilienbewegungen sind gut erkennbar (Joshi, 1995). Nach 5 Tagen in Kultur verschwinden die Zilienbewegungen vollständig. Ein Teil der Zellen

hat sich zu kleinen frei schwimmenden Vesikel formiert. Diese behielten ihre Zilien für weitere 8-10 Tage (Joshi, 1995).

Bei Walter (1995) bildeten 50% der Eileiterepithelzellen frei schwimmende Vesikel und behielten ihre Zilien bis Ende der Kulturperiode. Epithelzellen, welche sich an den Unterlagen angehaftet hatten, proliferierten und formierten sich zu einem konfluenten Zellrasen (Kervancioglu et al., 1994).

Es gibt unterschiedliche Angaben, wie lange die Zilien bei der Primärkultur von Eileiterepithelzellen erhalten bleiben (Kervancioglu et al., 1994; Joshi, 1995; Walter, 1995). Einige Autoren beobachteten Zilien bis zu 20 Tagen in Kultur (Joshi, 1995).

Nach der Passage in Subkultur sind keine Zilien mehr erkennbar. Es ist allerdings unklar, ob die Zilienzellen dedifferenzieren und deshalb ihre Zilien verlieren, oder ob die Zellen insgesamt degenerieren (Takeuchi et al., 1991; Ando et al., 2000).

Bei der Kultivierung von Eileiterepithelzellen auf Matrigel 10mg/ml hat Joshi (1995) eine interessante Beobachtung gemacht: die Epithelzellen heften sich schnell an das Substrat an, proliferieren aber nur langsam. Sie bildeten Sphären und längliche Tubuli aus und die Zellen halten ihre Polarität bei (Joshi, 1995).

Takeuchi et al. (1991) hatten in Kultur vom Eileiterepithel proliferierende Zellen für 5-20 Tage beobachtet. Sie konnten Zellen der 3. Generation anzüchten, das Wachstum wurde aber mit jeder Passage langsamer und die Konfluenz geringer.

### Morphologie der kultivierten Zellen

Adhärenente Eileiterepithelzellen in Zellkultur haben eine polygonale Form und besitzen einen großen, runden, zentral gelegenen Zellkernen mit lockerem Chromatin (Kervancioglu et al., 1994; Walter, 1995; Sattar et al., 1999). Walter (1995) hat mit Hilfe von Öl-Rot-Färbung Lipidtropfen in den Zellen festgestellt. Weitere Untersuchungen mit Periodic-Acid-Schiff Reaktion (PAS) und Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 zeigten Ansammlungen von Glykogen und saure Glykoproteinen in den Zellen. Kervancioglu et al. (1994) kultivierten ihre Zellen auf Membranfilter und konnten dabei die Polarität der Eileiterepithelzellen erhalten. Die Zellen zeigten eine deutlich geringere Dedifferenzierung im Vergleich zu anderen Kulturmethoden.

Die epitheliale Natur der kultivierten Zellen konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen Cytokeratine und mit transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden (Kervancioglu et al., 1994; Joshi, 1995; Walter, 1995).

---

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kultivierten Eileiterepithelzellen

Einige Autoren haben die kultivierten Eileiterepithelzellen mit elektronenmikroskopischen Methoden untersucht (Takeuchi et al., 1991; Kervancioglu et al., 1994; Joshi, 1995; Walter, 1995).

Joshi (1995) untersuchte die Auswirkung von verschiedenen Unterlagen auf das Zellwachstum transmissionselektronenmikroskopisch. Er beobachtete bei den Zellen, die auf Matrigel 10mg/ml kultiviert wurden, die Bildung von epithelialen Tubuli, deren sekretorische Zellen lange Mikrovilli, ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum, einen großen Golgi-Apparat und viele sekretorische Granula enthielten. Es wurden aber nur einzelne Zilien beobachtet.

Die Zellen, die auf Matrigel (Konzentration 2mg/ml) angezüchtet wurden, waren schmaler im Vergleich zu jenen, welche auf unbeschichteten Plastikgefäßen angezüchtet waren. Es konnten sowohl sekretorische als auch Zilienzellen im Monolayer nachgewiesen werden. Die Zilienzellen hatten zahlreiche Mitochondrien, die sekretorischen Zellen hatten wenig Mitochondrien, reichlich raues endoplasmatisches Retikulum, einen gut entwickelten Golgi-Apparat und viele sekretorische Granula.

Takeuchi et al. (1991) und Walter (1995) beschrieben zahlreiche Mikrovilli an der apikalen Zelloberfläche bei adhärennten Zellkulturzellen aus dem Eileiter. Weiterhin beobachteten sie, dass sie an der lateralen Zellmembran durch fingerförmige Einfaltungen miteinander verbunden werden.

Nach 7 Tagen Kultur konnten allerdings keine Zilien und Basalzellen mehr nachgewiesen werden.

Unterschiedliche Meinungen existieren über das Vorhandensein sekretorischer Granula in kultivierten Eileiterepithelzellen. Walter (1995) findet sie nur bis Tag 7 der Kultur, Takeuchi et al. (1991) beschreiben zahlreiche Granula auch nach 10-tägiger Kulturdauer. Bei Kervancioglu et al. (1994) finden sich sekretorische Granula sogar in Eileiterzellen nach der Passage in eine Subkultur. Während Joshi (1995) und Kervancioglu et al. (1994) eine Vielzahl von Organellen in den kultivierten Eileiterepithelzellen beobachten, beschreiben Takeuchi et al. (1991) außer rauem endoplasmatischem Retikulum (RER) nur sehr wenige Organellen. Walter (1995) findet in den meisten Zellen Glykogenansammlungen. Sie beschreibt die Zellkerne als unauffällig.

## 2.3 Dreidimensionale Organkulturen

Erste Untersuchungen mit Organkulturen wurden von Carrel (1912) durchgeführt. Er entnahm ein kleines Fragment eines Herzens einem 18 Tage alten Hühnerembryo und explantierte ihn in einen Plasmotropfen. Das Gewebe blieb über 3 Monate lebensfähig und zeigte die rhythmischen Kontraktionen der Herzmuskulatur.

Carrel (1912) beobachtete, dass sich das Fragment während der Kultur nicht vergrößerte aber eine sphärische Form annahm. Außerdem stellte er fest, dass die Zellen im Inneren des Explantats nekrotisch wurden. Im Gegensatz dazu blieben die Zellen in der Peripherie, die einen deutlich besseren Zugang zum Nährmedium hatten, lebensfähig. Diese Versuche waren die erste Demonstration, dass explantiertes Gewebe außerhalb des Organismus *in vitro* für bestimmte Zeit seine normale Funktionalität behalten kann. Es war auch das grundlegende Experiment bei der Etablierung einer dreidimensionalen Organkultur oder Histokultur.

Bis 1956 waren Monolayerzellkulturen, bei denen Zellen auf einer Glas- oder Plastikoberfläche in eine Schicht wuchsen, die vorwiegend eingesetzte Zellkulturmethode. Da bei ihnen die dreidimensionale Struktur des Gewebes nicht erhalten ist, erwies sich ihre Einsatzfähigkeit als begrenzt. 1957 wurde die dreidimensionale Organkultur, die Carrel (1912) eingeführt hatte, von Leighton (1957) weiter entwickelt. Leighton (1957) benutzte als Unterlage für die Gewebefragmente kleine Celluloseschwämmchen, die in Glasröhrchen („Leighton tubes“) eingesetzt wurden. Die Kultur wurde auf einem Schüttelgerät inkubiert. Desweiteren hatte Leighton et al. (1957) auch Gelatineschwämmchen verwendet. Dabei zeigte sich, dass Gelatineschwämmchen besser für die histologische Aufarbeitung als die Celluloseschwämmchen geeignet waren, aber während der Kultur schneller von Gewebeenzymen zersetzt wurden.

In anderen Untersuchungen wurden Kollagen-Gele für Organkultur verwendet. Dabei werden Zellen oder Gewebestücke in Kollagengel eingebettet und kultiviert. Nandi et al. (1979) haben diese Methode für die Kultur von normalem und tumorös verändertem Milchdrüsengewebe angewandt. Dabei organisierten sich die Zellen zu relativ dichten, kanälchenartigen Strukturen. Die Zellen in dieser Kultur vermehrten sich über einen Zeitraum von mehreren Wochen, wobei nur wenige Fibroblasten zu beobachten waren. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu Monolayerkulturen, bei denen die Überwucherung mit Fibroblasten ein großes Problem darstellt. Histologisch sah das *in vitro* kultivierte Gewebe dem *in vivo* entnommenen Gewebe sehr ähnlich. Es konnte auch auf neuen Kollagengelen weiter kultiviert werden. Im Unter-

schied dazu verlieren die Zellen von Monolayern relativ rasch ihre Proliferationsfähigkeit und Funktion.

Fell und Robison (1929) haben eine weitere Methode der Organkultur entwickelt, nämlich die Filter- oder Gitter-unterstützte Organkultur. Dabei behielt das Gewebe eine Struktur, die der in vivo sehr nahe kam. Als Nachteile der dreidimensionalen Organkultur wird die Heterogenität der Zellen im Vergleich zu permanenten Zelllinien genannt. Auch die Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen ist schwieriger im Vergleich zu Monolayerkulturen (Hoffman, 1991).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Gewebeentnahme**

##### **3.1.1 Entnahme und Präparation der Gewebeproben**

Ausgangsmaterial waren Eileiter von metöstrischen Kühen und Färsen, die am Schlachthof München präpariert wurden. Der Zyklusstand wurde anhand der Funktionsgebilde der Ovarien beurteilt. Als metöstrische Tiere wurden solche definiert, die ein Corpus luteum (Corpus rubrum) in Ausbildung und zum Teil noch Brunstschleim aufwiesen.

Nach ihrer Präparation wurden die Eileiter an der Isthmusseite vom Uterushorn abgetrennt und an beiden Enden mit chirurgischem Nahtmaterial ligiert. Sie wurden dann mit antibiotikahaltiger PBS-Lösung/PBS (P/S) gewaschen und in PBS (P/S) auf Eis ins Labor transportiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS (P/S) wurden die Eileiter einzeln an den abgebundenen Enden mittels Kanülen auf einem mit steriler Alufolie überzogenen Styroporbrett fixiert und von anhaftenden Ligamentresten befreit, um eine Kontamination der Kultur mit Fibroblasten möglichst gering zu halten.

Danach wurde der Eileiter in longitudinaler Richtung eröffnet, gespannt mit der luminalen Seite nach oben ausgebreitet und in kleine Stückchen von 0,3 cm Seitenlänge geschnitten.

Die Eileiterfragmente wurden vorsichtig mit der luminalen Seite nach oben auf kleine Gelatinechwämmchen (Gelfoam sponges, Firma Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) platziert. Die Kulturschalen wurden mit Kulturmedium DMEM + 10% FBS gefüllt und zwar so, dass die Proben nahezu vollständig eintauchten, die luminale Oberfläche aber frei blieb. Die Proben wurden dann im Brutschrank bei 38,5° und 5% CO<sub>2</sub> für 2, 4 oder 7 Tage kultiviert.

## **3.2 Lichtmikroskopie**

### **3.2.1 Fixierung und Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie**

#### *3.2.1.1 Fixierung*

Als Fixans diente für die lichtmikroskopischen Untersuchungen Bouin (B)-Lösung (Zusammensetzung siehe Anhang). Um eine optimale Fixierung zu gewährleisten, wurden die Proben für 24 Stunden in der Bouin-Lösung belassen.

#### *3.2.1.2 Anfertigung von Paraplastschnitten*

Im Anschluß an die Fixierung wurden die Proben zur Entwässerung jeweils 72 Stunden mit zweimaligem Wechsel nach je 24 Stunden in 70% Ethanol belassen. Die Entwässerungsreihe (1x Ethanol 80%, 1x Ethanol 90%, 2x Isopropanol, 2x Xylol) und die darauf folgende Einbettung in Paraplast über 24 Stunden erfolgte in einem Einbettungsautomaten der Firma Shandon Duplex Prozessor (Firma Reichert-Jung, Wien/Österreich).

Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des Histostat-Tissue-Embedding Centers (Firma Reichert-Jung, Wien/Österreich) ausgegossen. Das Ausblocken kleiner Präparate erfolgt in kleinen quadratischen Paraplastschalen mit Rahmen. Zum Abkühlen standen die ausgegossenen Blöcke circa 3 bis 4 Stunden auf einer Kühlplatte. Nach der Entfernung der Rahmen wurden die Blöcke bis zum Schneiden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms Typ 1516 (Firma Leitz GmbH, Wetzlar) wurden von den Proben Serienschnitte (jeweils 5 µm dick) hergestellt und auf unbeschichtete (SuperFrost®) und beschichtete Objektträger (SupraFrostUltraPlus® adhäsiv) aufgezogen (Firma Menzel-Gläser, Stuttgart). Die angefertigten Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung im Wärmeschrank bei 40°C aufbewahrt. Diese Schnitte wurden weiter für die konventionellen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Färbungen verwendet.

### **3.2.2 Histologische Übersichtsfärbungen**

Hämalaun-Eosin (H.E.) nach Meier (Romeis, 1989).

Damit wurde bei den Schnittserien jeder 10. Schnitt gefärbt. In dieser Übersichtsfärbung heben sich die Kerne blau vom übrigen rosaroten Gewebe ab.

Trichromfärbung nach Masson und Goldner (Romeis, 1989)

Die Zellkerne erscheinen durch das Eisenhämatoxylin nach Weigert braun bis schwarz. Das Zytoplasma färbt sich ziegelrot, die Erythrozyten färben sich orange, während das Bindegewebe und der Schleim einen grünen Farbton annehmen.

Alcianblau-Färbung (Romeis, 1989):

Diese Färbung erlaubt einen Nachweis von sauren Mukosubstanzen. Sie wird parallel bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Hierbei können dann Carboxyl- (bei pH 2,5) von Sulfatgruppen (bei pH 1,0) unterschieden werden. Bei einer positiven Reaktion sind die jeweiligen Mukosubstanzen blau, während sich die Kerne hellrot anfärben.

Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) (Romeis, 1989):

Bei der Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) nach McManus werden komplexe Kohlenhydrate nachgewiesen. Sie erscheinen rosa bis violett. Die Kerne werden mit Hämalaun blau gefärbt.

Silberimprägnation nach Gomori (Romeis, 1989):

Bei der Silberimprägnation nach Gomori werden die angebotenen Silber-Ionen durch die Aldehydgruppen, die durch Oxidation entstanden sind, zu metallischem Silber reduziert. Durch den Gehalt an assoziierten Glykoproteinen reagieren vor allem Basalmembran und retikuläre Fasern mit Silber und erscheinen schwarz.

### Durchführung der Färbungen:

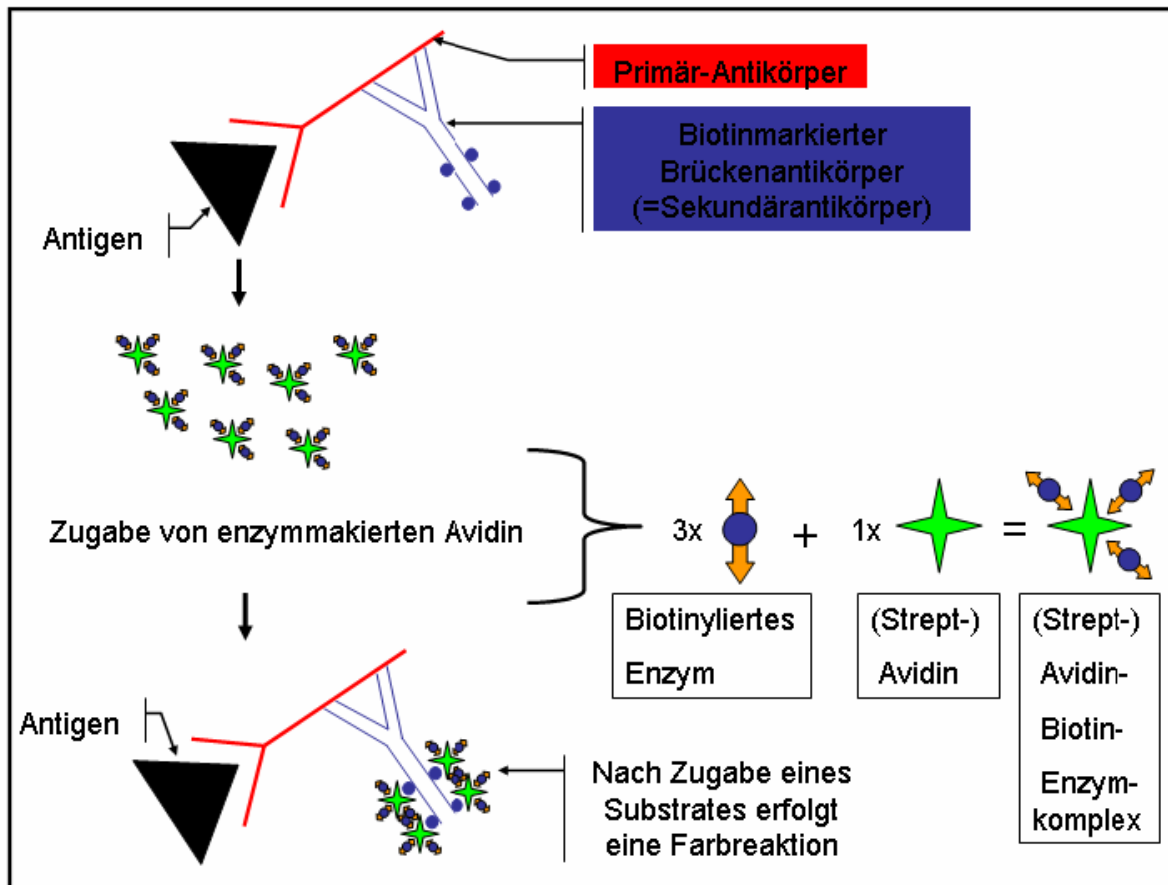
Sämtliche Schnitte wurden hierzu in Xylol (2x30 min) entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe (2x Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, jeweils nur kurz durchziehen) rehydriert, dann gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylol (2x10 min) belassen. Die Schnitte wurden dann mit Eukitt® (Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland) eingedeckt.

## 3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

### 3.2.3.1 ABC – Methode

Bei diesen Untersuchungen wurde die „Avidin-Biotin-Complex-Methode“ („ABC-Methode“ nach Hsu et al., 1981) angewandt. Diese beruht auf der sehr hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß, zum Vitamin Biotin. Avidin kann vier Moleküle von Biotin binden. Dabei kann Avidin durch Streptavidin ersetzt werden, einem chemisch exakt definierten Produkt, das auf biotechnologischem Weg entwickelt wurde. Es wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Der Primärantikörper wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an einen Komplex aus Streptavidin und eine biotinylierte Peroxidase gebunden. Durch ein besonderes Mischungsverhältnis der beiden Reaktionspartner Streptavidin und Peroxidase bleiben noch einige Biotin-Bindungsstellen am Molekül frei, die mit dem Biotin des Sekundärantikörpers reagieren können. Anschließend wird die Peroxidaseaktivität durch ein geeignetes Substrat (hier 3,3 Diaminobenzidin, DAB) sichtbar gemacht. Die entstehenden braunen Farbprodukte machen den Antigen-Antikörper-Komplex und damit die lokalen Immunreaktionen sichtbar.





**Abb. 10** Schematische Darstellung der ABC-Methode modifiziert nach Höfler et al. (1994)

**Tab. 1      Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen**

Primär-AK Gegen	Verdünnung Inkubation	AK- liefernde Tierart	Hersteller (Primär AK)	Sekundär- AK (Verdünnung Inkubation)	Positiv- kontrolle	Vorbehandlung	Methode
Progesteron- Rezeptor	1:200, über Nacht bei 4°C	Maus	Beckman- Coulter (Krefeld)	Anti-Maus IgG biot.vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:300 für 30 min RT	Uterus	Hitzebehandlung i.d. Mikrowelle, 3 x 5 min im Citratpuffer	ABC
Östrogen- Rezeptor	1:400, über Nacht bei 4°C	Kaninchen	Santa Cruz (Kalifornien, USA)	Anti-Maus IgG biot.vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:300 für 30 min RT	Uterus	Hitzebehandlung i.d. Mikrowelle, 3 x 5 min im Citratpuffer	ABC
„Uterine Milk Prote- in“	1:200, über Nacht bei 6°C	Maus	Beckman- Coulter (Krefeld)	Anti-Maus IgG biot.vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:300 für 30 min RT	Uterus	Hitzebehandlung i.d. Mikrowelle, 2 x 10 min Dako pH 6,1	ABC
Oviduktales Glycoprotein	1:200, über Nacht bei 4°C	Maus	Beckman- Coulter (Krefeld)	Anti-Maus IgG biot.vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) Verd: 1:300 für 30 min RT	Uterus	Peroxidase hemmen in 50ml Hydrogenperoxid + 150 ml Aqua dest für 10 min RT	ABC

Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer ist im Anhang angegeben. Bei jedem Durchgang wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt, um die Spezifität der Reaktion sicher zu stellen. Positivkontrollen umfassten Gewebe, von denen nachgewiesen ist, dass sie das verwendete Antigen enthalten. Bei den Negativkontrollen wurde der Primär-Antikörper durch Puffer (Dako, Hamburg) ersetzt.

Immunhistochemische Einfachfärbung:

Je nach verwendetem Antikörper wurde entweder „Phosphate Buffered Saline“ (PBS)-Puffer (pH 7,4) oder „Tris Buffered Saline“ (TBS)-Puffer (pH 7,4) verwendet (vgl. Anhang).

Die jeweiligen Antikörper, Vorbehandlungen, Inkubationszeiten und Sekundärantikörper sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

1. Aufbewahrung der zu behandelnden Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 40°C für 12 Stunden vor Behandlungsbeginn
2. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2x20 min)
3. Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (2x Isopropanol, 1x Ethanol 96%, 1x Ethanol 70%, jeweils Schnitte kurz durchziehen)
4. Waschen in Aqua dest. 2x5 min
5. Spülen im jeweiligen Puffer (Tab.1) 2x5 min
6. Entsprechende Vorbehandlung (Tab.1)
7. Spülen im jeweiligen Puffer 2x5 min
8. Endogene Peroxidase hemmen mit Hydrogenperoxid (10%) bei Raumtemperatur (RT) für 10 min, Inkubieren in feuchter Kammer
9. Spülen in fließendem Leitungswasser für 10 min
10. Spülen in jeweiligem Puffer 2x5 min
11. Blockierung unspezifischer Bindungen für Antikörper mit Dako Protein-Block-Serum-Free, 10 min, bei RT.
12. Abgießen des Blockers und Auftragen des jeweiligen AK, Inkubation für die in Tab.1 genannten Zeiten.
13. 2x5 min waschen im jeweiligen Puffer
14. Jeweiligen Sekundärantikörper auftragen und 30 min bei RT inkubieren
15. 2x5 min waschen in entsprechendem Puffer

16. Markierung des Sekundärantikörpers mit Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Komplex (StreptAB/HRP-Complex der Firma Dako, Hamburg)

17. 2x5 min mit jeweiligem Puffer spülen

18. Entwicklung der Reaktion in DAB-Lösung unter Lichtabschluss für jeweils 5 bis 10 min (Rezept für DAB, siehe Anhang)

19. Kurz spülen in Leitungswasser

20. Kerngegenfärbung mit Hämalaun (Mayer) für circa 30 sek (außer Progesteronrezeptor und Östrogenrezeptoren)

21. Fließend wässern für 10 min

22. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (1x Ethanol 70%, 1x Ethanol 96%, 2x Isopropanol), jeweils kurz durchspülen

23. Entfernen des Alkoholes mit Xylol (1x10 min, 1x20 min)

24. Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt® (Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland)

25. Trocknen im Brutschrank bei 40°C über 12 Stunden

### 3.2.4 Auswertung

Die Auswertung und fotografische Dokumentation der Schnitte (konventionelle Färbungen und Immunhistochemie) erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Leitz Aristoplan (Leitz GmbH, Wetzlar), an das eine Canon-Powershot A95-Digitalkamera gekoppelt war.

Die Ergebnisse wurden semiquantitativ folgendermaßen bewertet:

Negativ	Keine Färbung	-
schwach positiv	spezifisch, aber schwache Färbung	+
deutlich positiv	deutliche Färbung	++
stark positiv	Kräftige Färbung	+++

### **3.3 Gewebekultur**

#### Organgewebekultur auf Kollagenmatrix

Diese Methode wurde von Chishima et al. (1997) adaptiert und nach Chen et al. (2003) und Papini et al. (2004) modifiziert. Sterile Kollagenschwämmchen (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) aus gereinigter Schweinehautgelatine werden vor der Anwendung zuerst prähydriert mit DMEM-Medium, das 10% fetale bovine Serum (FBS; 2 mM L-glutamine and 1 x Penicillin-Streptomycin Lösung mit 1,25 x Antimikotikum-Lösung) enthält.

Ein Schwämmchen wurde in sechs Stückchen (10x20x7 mm) unterteilt und jedes Stückchen wurde in ein well innerhalb eines 6-well transferiert (Falcon Plastics Inc., London, Ontario, Canada). Auf jedes Schwämmchen wurde ein 2-3 mm<sup>3</sup> großes Fragment von bovinem Eileiter mit der epithelialen Oberfläche nach oben positioniert, so dass die Epithelschicht nach einer Zugabe von 3,5 ml Kulturmedium an der Grenze zwischen Luft und Medium lag. Die Kultur wurde anschließend bei einer Temperatur von 37°C und einer Feuchtigkeit von 5%CO<sub>2</sub>/95% Luftatmosphäre inkubiert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Am Tag 2, Tag 4 und Tag 7 wurden Proben aus der Kultur entfernt. Anschließend wurden sie in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **3.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie**

#### **3.4.1 Probenaufbereitung**

#### **3.4.2 Immersionsfixierung**

Die Proben wurden nach Entnahme an den Tagen: Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 7 in Fixierungsflüssigkeit nach Karnovsky (1965) verbracht (Zusammensetzung siehe Anhang). Dieses Fixans besteht aus zwei Hauptkomponenten (Formaldehyd und Glutaraldehyd), die jeweils erst kurz vor Anwendung gemischt werden dürfen. In dieser Fixierlösung verblieben die Proben für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend wurden die Präparate in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 3x je 60 Minuten eingebracht. Die weitere Fixierung und Vorkontrastierung erfolgte in Osmiumtetroxid(1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%). Abschließend wurden die Proben drei mal je 20 min in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer gespült. Die Proben wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 min, dann 3x30 min Ethanol) dehydriert und über Propylenoxid (2x30 min, 1Stunde Propylen: Epon (2:1), 24 Stunden in Propylen:Epon (1:1), 60 min pures Epon) in Epon eingebettet. Zuletzt wurden die Gewebeproben in kleine Plastikförmchen gegossen und über 48 Stunden im Wärmeschrank (60° C) polymerisiert.

Mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Färbung dieser erfolgte mit Methylenblau nach Richardson (1963). Waren die gesuchten Bereiche in den Semidünnschnitten gefunden, wurden Ultradünnschnitte mit 60 nm Dicke angefertigt. Für diese Technik wurde ein spezielles Drukker Ultramikrotommesser (Firma Element Six B.V., Cuijk, Niederlande) verwendet. Die einzelnen Schnitte wurden auf Kupfernetzchen (Maschenweite 150 mesh, Firma SCI, Science Services, München, Deutschland) aufgefangen, aufgezogen und nachkontrastiert (10 min in wässriger gesättigter Uranylacetatlösung, 3 min. in Bleicitrat nach Reynolds, 1963). Die nachfolgende Auswertung und die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss EM 902 Filter-Elektronenmikroskop.

### **3.5 Gewinnung und Auswertung morphometrischer Daten**

Die Epithelhöhen wurden mit Hilfe des Morphometrieprogrammes WCIF ImageJ (National Institutes of Health, Maryland.) ermittelt. Hierzu wurden zunächst alle verwendeten Vergrößerungen (4x, 25x, 40x ) kalibriert. Die Ermittlung der Epithelhöhen erfolgte aus fünf unterschiedlichen Bereichen der jeweiligen Probe. Pro Bereich wurden fünf Stellen gemessen und dann aus allen Werten der einzelnen Probe der Mittelwert ermittelt.

Bei den immunhistochemischen Nachweisen der Hormonrezeptoren (Progesteronrezeptor und Östrogenrezeptor) wurden die Zellkerne in 4 Reaktionsgruppen eingeteilt: negativ (-), schwach positiv (+), deutlich positiv (++), stark positiv (+++).

Die graphische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Excel für Windows.

### **3.6 Glykohistochemische Untersuchungen**

#### **3.6.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Lektinbindungsstellen in 3D-Organkulturen des bovinen Eileiters**

Zum Nachweis von Glykokonjugaten im Eileiterepithel wurden die in Tabelle 4 angegebenen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markierten Lektine (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) verwendet. Dieser Nachweis erfolgte nach der direkten Methode, bei der das direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugierte Lektin an den spezifischen Zucker bindet. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2x30 min) und Rehydrieren in einer absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
2. Waschen in 0,05 M TRIS Puffer, pH 6,8, 3x5 min
3. Beschichtung der Schnitte mit FITC- markiertem Lektin (Konzentration 12 µg/ml TRIS Puffer). Inkubation in einer feuchten Kammer für eine Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur
4. Spülen in 0,05 M TRIS Puffer, pH 6,8, 3x5 min
5. Eindeckeln der Schnitte mit einem Gemisch aus Polyvinylalkohol und Ethylenglycol (Serva, Heidelberg)

6. Aufbewahrung der fertigen Schnitte bis zur Auswertung im Kühlschrank bei 4°C

Negativkontrolle:

Um mögliche Eigenfluoreszenz des Gewebes zu erkennen, wurden Negativkontrollen des jeweilig zu untersuchenden Präparates angefertigt. Hierbei wurde anstelle der Lektinlösung mit der entsprechenden Menge an TRIS Puffer inkubiert.

Kompetitive Hemmung:

Die Spezifität der einzelnen Lektine wurde durch kompetitive Hemmung mit den jeweils korrespondierenden Zucker überprüft. Dazu wurden die Lektine mit einer 0,2 M Lösung des entsprechenden Hemmzuckers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit bei Punkt drei anstelle der Lektinlösung aufpipettiert.

Positivkontrolle:

Um das Funktionieren des jeweilig verwendeten Lektins zu überprüfen, wurden zudem Positivkontrollen angefertigt. Hierzu wurde Gewebe verwendet, bei dem bekannt ist, dass es mit den entsprechenden Lektinen reagiert.

Auswertung:

Die Auswertung der Präparate der glykohistochemischen Untersuchungen erfolgte an einem Auflichtfluoreszenzmikroskop Dialux 20 der Firma Leitz GmbH, Wetzlar.



**Tab. 2    Verwendete Lektine**

Abkürzung	Lektin	Herkunft	Spezifität des Zuckers	Hemmsucker
Con A	Canavalia ensiforme Agglutinin	Schwertbohne	$\alpha$ -D-Man $\alpha$ -D-Glc>GlcNAc	Mannose
WGA	Triticum vulgare Agglutinin	Weizen	Endständiges GlcNAc-[( $\beta$ 1,4)-GlcNAc]1-2>( $\beta$ -GlcNAc) $n$ >Neu5Ac	N-Acetyl-Galaktosamin
RCA 120	Ricinus communis Agglutinin	Ricinus	D- Galactose	Galaktose N-Acetyl-Galaktosamin
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin	Stechginster	Fukose,(D-GlcNAc)2	A-L-Fukose
DBA	Dolichus biflorus Agglutinin	Pferdebohne	GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
PNA	Arachis hypogaea Agglutinin	Erdnuss	endständiges Gal-( $\beta$ 1,3)-GalNAc	Galaktose
WGA succ.	Wheat germ Agglutinin succinyliert	Weizen	GalNAc	N-Acetyl-Glukosamin
PSA	Pisum sativum Agglutinin	Erbse	$\alpha$ -D-Man $\alpha$ -D-Glc	Glukose Mannose

Gal = D-(+) – Galactose, Glc = D-(+) – Glucose, Man = D-(+) – Mannose, GalNAc = N–Acetyl–D-Galaktosamin, GlcNAc = N–Acetyl–D–Glucosamin

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histomorphologie

#### 4.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

##### *4.1.1.1 Histomorphologische Befunde am Eileiter des Rindes am Tag 0 (ex vivo)*

Das Lumen des Eileiters ist in den verschiedenen Segmenten unterschiedlich groß. Es ist im Isthmus wesentlich weiter als in der Ampulla, obwohl die Ampulla einen deutlich größeren äußeren Organquerschnitt hat als der Isthmus. Auch die Faltenstruktur unterscheidet sich in den verschiedenen Segmenten des Eileiters. Im Isthmus kommen wenige Falten vor. Sie haben eine breite Basis und werden schmaler in Richtung Lumen. In der Ampulla sind die Falten schmaler und länger. Sie weisen viele Verzweigungen (Sekundärfalten, Tertiärfalten) auf und füllen den grössten Teil des Eileiterlumens aus, wobei sie sich teilweise bis über die Mitte des Lumens erstrecken. Die morphologischen Veränderungen finden zwischen den Segmenten fließend statt.

Die Lamina propria dient den Falten als bindegewebiges Gerüst, in welchem Blutgefäße und Nerven verlaufen. Die innere Auskleidung des Lumens bildet ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel. Sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus sind circa 50% zilientragende Zellen mit deutlichem Blepharoblastensaum vorhanden. In der Ampulla kommen Zellvorwölbungen an den apikalen Zellpolen der sekretorischen Zellen vor, so genannte Protrusionen. Sie können neben Zellorganellen Zellkerne bzw. Kernteile enthalten. Im Isthmus kommen diese Protrusionen grundsätzlich nicht vor.

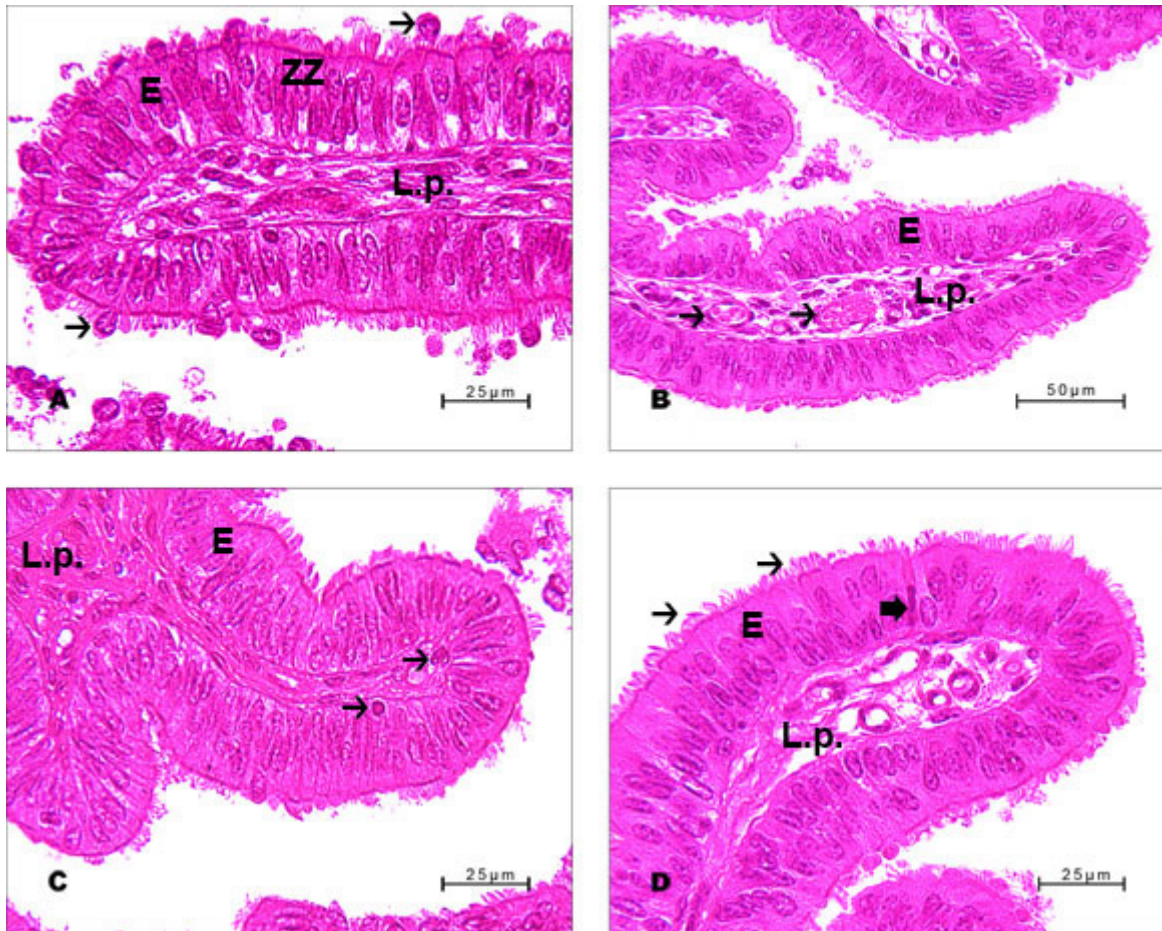
Das Eileiterepithel besteht aus zilientragenden und sekretorischen Zellen. Die Zellkerne der zilientragenden Zellen liegen im Allgemeinen mittig bis apikal im Zytoplasma. Sie haben eine runde Form und ein helles Karyoplasma (euchromatisch). Die Kerne der sekretorischen Zellen liegen weiter basal, haben eine ovale Form und sind dunkel gefärbt (heterochromatisch). Sie können aber auch in die Protrusionen verlagert sein. Die zilientragenden Zellen haben eine becherförmige Gestalt. Sie sind basal recht schmal und verbreitern sich nach apikal, so dass die Zilien einen großen Teil der Epitheloberfläche bedecken. Insbesondere im Isthmus erweckt es den Eindruck, als sei die Epitheloberfläche von einem lückenlosen Zilienrasen bedeckt. In den basalen, konkaven Epithelbereichen zwischen zwei Falten können wenig sekretorische und vermehrt zilientragende Zellen identifiziert werden. Die sekretorischen Zel-

len sitzen der Basalmembran breit auf und werden schmaler nach apikal. Deshalb bilden sie nur einen sehr kleinen Anteil der epithelialen Oberfläche. Eine Ausnahme sind die Zellen die Protrusionen haben, ihre Form ist dann auch becherförmig. In beiden Segmenten sind im unteren Drittel des Epithels so genannte „Basalzellen“ vorhanden. Sie erreichen das Eileiterlumen nicht, sind klein, rund und haben sehr dunkle (hyperchromatische) Kerne. Der Zytoplasmaanteil ist sehr gering. Bei ihnen handelt es sich vorwiegend um intraepitheliale Lymphozyten. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse während der einzelnen Kultivierungszeiten tabellarisch zusammengefaßt.

**Tab. 3 Histomorphologische Befunde der Ampulla am bovinen Eileiter am Tag 0.**

Lamina epithelialis	Epithelart	Einschichtig
	Zellform	Hochprismatisch
	Falten	Primärfalten, viele Verzweigungen
	Basalmembran	Eben, ununterbrochen
	Mikrovilli	++
	Protrusionen	++
Zilienzellen (ZZ)	Zilien	++/ +++
	Zellform	Kegel- bis kelchförmig
	Zellkernlage	Mittig bis apikal
	Zytoplasmafärbung	Hell
	Zellkern, -färbung	Rund, euchromatisch
Sekretorisch Zellen (SZ)	Zellform	Basal breit, verjüngen zur Oberfläche
	Zellkernlage	Basal
	Zytoplasmafärbung	Dunkler als bei ZZ
	Zellkern, -färbung	Oval, heterochromatisch
Basalzellen (Lymphozyten)	Kleine, runde Zellen, mit heterochromatischen Kernen und wenig Zytoplasma Meistens intraepitheliale Lymphozyten	+
Stiftchenzellen	Schmale Zellen mit stiftchenförmigem Kern Kollabierte bzw. degenerierte Epithelzellen	+
Lamina propria	Kompakt, faserreich	++
Tunica muscularis	Längsschicht	+
	Zirkulärschicht	+
Gefäße	Sowohl in Lamina propria, als auch in Tunica muscularis und Subserosa Verschiedene Grössen	++

+ = wenig, ++ = gehäuft, +++ = viele



**Abb. 3** A, B, C, D: Ampulla (Metöstrus), HE-Färbung, Tag 0.

A: Das Epithel (E) der Ampulla ist einschichtig hochprismatisch und setzt sich aus becherförmigen Zilienzellen (ZZ) und protrusionsbildenden (Pfeil) sekretorischen Zellen zusammen.

L.p.= Lamina propria

B: Das Epithel (E) der Primärfalten innerhalb der Eileiterampulle wird von kompaktem Bindegewebe (L.p.), welches kleinere und größere Gefäße (Pfeil) enthält, unterlagert.

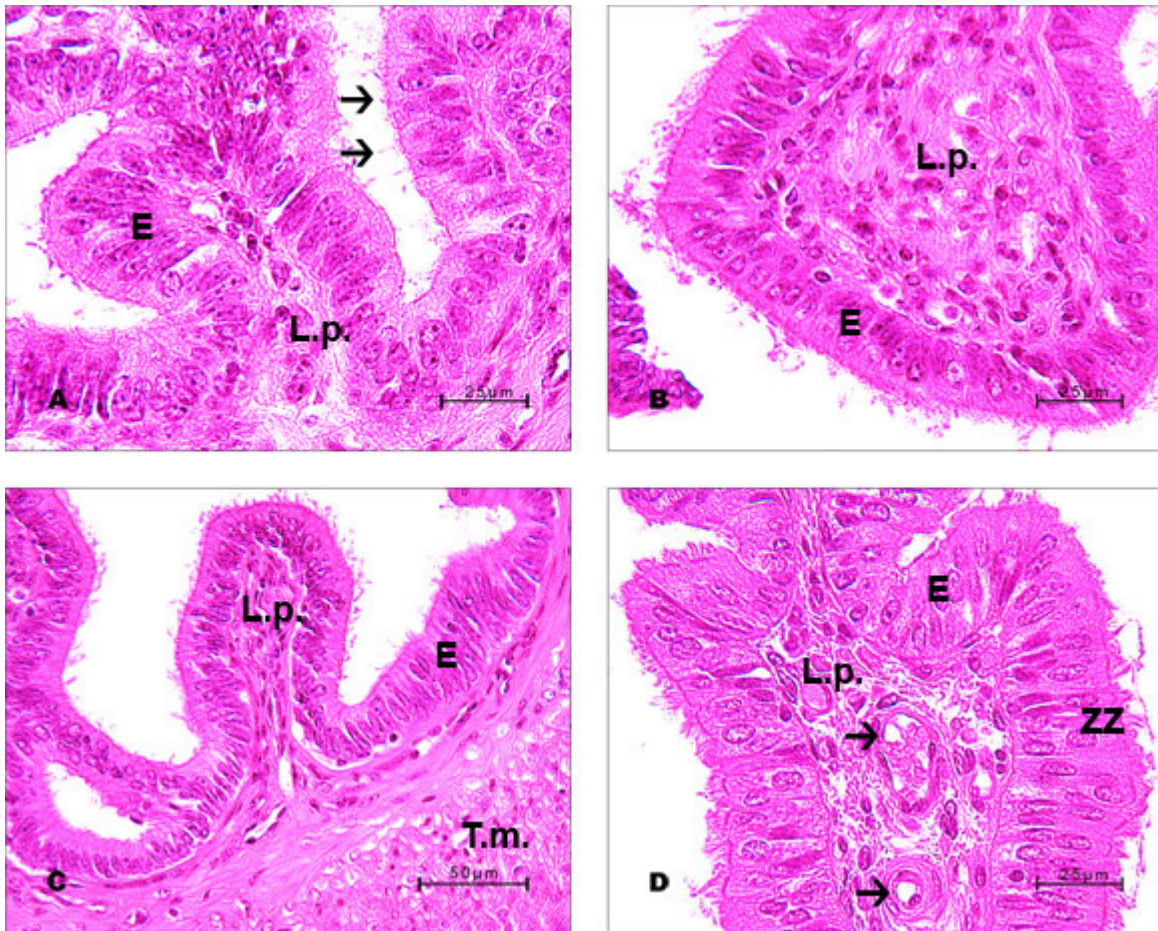
C: Im basalen Bereich des Eileiterepithels (E) der Ampulla sind kleine runde Lymphozyten (Pfeil) erkennbar. L.p.= Lamina propria

D: Am apikalen Saum des Eileiterepithels (E) sind büschelförmige Kinozilien (Pfeil) zu beobachten. Desweiteren sind innerhalb des Epithels Stiftchenzellen (großer Pfeil) zu lokalisieren. L.p.= Lamina propria

**Tab. 4 Histomorphologische Befunde des Isthmus am bovinen Eileiter am Tag 0.**

Lamina epithelialis	Epithelart	Einschichtig
	Zellform	Hochprismatisch
	Falten	Primärfalten, viele Verzweigungen
	Basalmembran	Eben, ununterbrochen
	Mikrovilli	++
	Protrusionen	++
Zilienzellen (ZZ)	Zilien	++/ +++
	Zellform	Kegel- bis kelchförmig
	Zellkernlage	Mittig bis apikal
	Zytoplasmafärbung	Hell
	Zellkern, -färbung	Rund, euchromatisch
Sekretorische Zellen (SZ)	Zellform	Basis breit, verjüngen sich zur Oberfläche
	Zellkernlage	Basal
	Zytoplasmafärbung	Dunkler als bei ZZ
	Zellkern, -färbung	Oval, heterochromatisch
Basalzellen (Lymphozyten)	Kleine, runde Zellen, mit heterochromatischen Kernen und wenig Zytoplasma. Debris	+
Stiftchenzellen	Schmale Zellen mit stiftchenförmigen Kern Kollabierte bzw. degenerierte Epithelzellen	+
Lamina propria	Kompakt, faserreich	++
Tunica muscularis	Längsschicht	++
	Zirkulärschicht	++
Gefäße	Sowohl in Lamina propria, als auch in Tunica muscularis und Subserosa.	++

+ = wenig, ++ = gehäuft, +++ = viel



**Abb. 4** A, B, C, D: Isthmus, HE-Färbung, Tag 0.

A: Im einschichtig hochprismatischen Epithel (E) des Isthmus liegen die Zellkerne beider Zelltypen annähernd auf gleicher Höhe. Im apikalen Bereich sind weniger stark ausgeprägte Zilienbüschel (Pfeil) sichtbar. L.p.= Lamina propria

B: Innerhalb der Primärfalten des Isthmus ist, im Vergleich zur Ampulla, mehr Bindegewebe vorhanden. Am Tag 0 liegen die Fibrozyten dicht aneinander. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

C: Das Bindegewebe der Lamina propria (L.p.) zieht deutlich in die Primärfalten des Isthmus ein. Die Lamina propria wird von einer starken Tunica muscularis (T.m.) unterlagert. Epithel = E

D: Innerhalb des Bindegewebes (L.p.) sind zahlreiche Arteriolen und Venolen (Pfeil) erkennbar. Auffallend sind becherförmige Zilienzellen (ZZ) mit großem runden Zellkern und hellem Zytoplasma. Epithel = E



#### *4.1.1.2 Histomorphologische Befunde am Eileiter des Rindes am Tag 2*

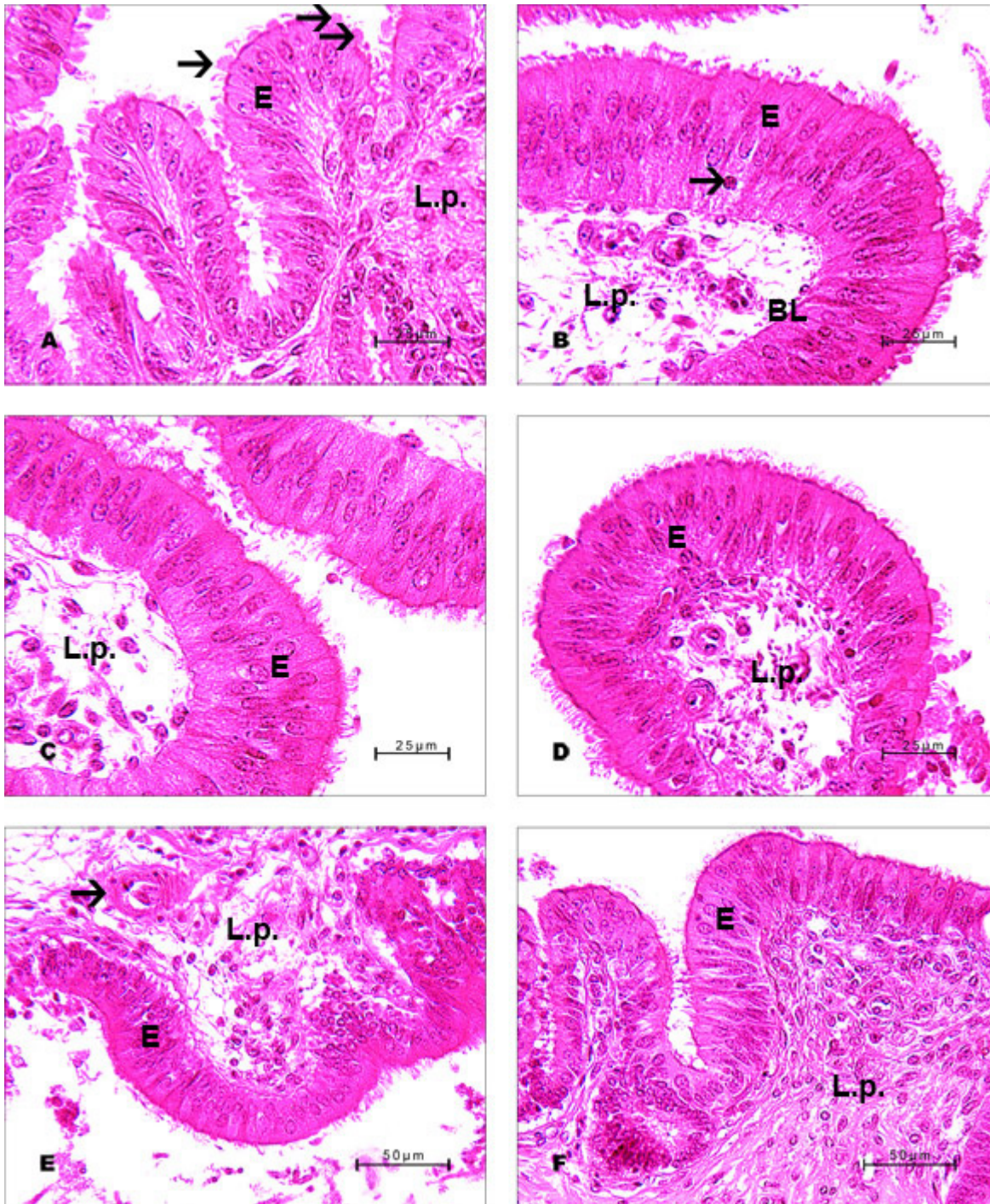
Tag 2: Die Lamina propria erscheint in der Ampulla im Vergleich zu Tag 0 lockerer und zellärmer. Im Isthmus ist die Lamina propria etwas kompakter. Die Gefäße in ihr sind gut erhalten. Die Lamina epithelialis besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen sind gut erhalten. Bei den sekretorischen Zellen sind Protrusionen zu beobachten. Einige von ihnen enthalten Kerne. Es werden auch Stützchenzellen beobachtet. In beiden Segmenten, Ampulla und Isthmus, sind in der Nähe der Basallamina Lymphozyten zu finden. Die Tunica muscularis ist in der Ampulla nicht gut abgrenzbar. Im Isthmus dagegen können eine longitudinale und zirkuläre Schicht gut differenziert werden. Die Gefäße in der Tela subserosa sind gut erhalten.

**Tab. 5 Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 2**

Lamina epithelialis	Epithelart	Einschichtig
	Zellform	Länglich
	Falten	
	Basalmembran	Teilweise unterbrochen
	Mikrovilli	++
	Protrusionen	++
Zilienzellen (ZZ)	Zilien	++/ +++
	Zellform	Längsform + Vakuolen
	Zellkernlage	Basal bis apikal
	Zytoplasmafärbung	Hell
	Zellkern, -färbung	Oval, euchromatisch
Sekretorische Zellen (SZ)	Zellform	Becherform
	Zellkernlage	Basal bis mittig
	Zytoplasmafärbung	Dunkler als bei ZZ
	Zellkern, -färbung	Oval, heterochromatisch
Basalzellen (Lymphozyten)	Kleine, runde Zellen, mit heterochromatischen Kernen und wenig Zytoplasma	++
Stiftchenzellen	Schmale Zellen mit Stiftchenförmigen Kern Kollabierte bzw. degenerierte Epithelzellen	++
Lamina propria	Lockeres bis sehr lockeres Bindegewebe, Grundlage der Falten, enthält freie Bindegewebszellen	++
Tunica muscularis	Längsschicht	Nicht immer gut abgrenzbar Im Isthmus ist die Muskelschicht breiter als in Ampulla
	Zirkulärschicht	
Gefäße	Sowohl in der Lamina propria, als auch in Tunica muscularis und Subserosa sind die Gefäße gut erhalten	++
Schwämmchen	Vorhanden	Viele ausgewanderte Zellen, Zellgirlanden, Zellen in Mitose; Blutzellen

+ = wenig, ++ = gehäuft, +++ = viele





**Abb. 5** A, B, C: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 2.

D, E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 2.

A: Das einschichtig hochprismatische Epithel (E) der Ampulla setzt sich aus gut erhaltenen sekretorischen Zellen und Zilienzellen zusammen. Die schmalen sekretorischen Zellen bilden zahlreiche ballonartige Protrusionen (Pfeil) aus, welche sich ins Lumen vorwölben.

L.p.= Lamina propria

B: Das einschichtig hochprismatische Epithel (E) erscheint in regelmäßiger Anordnung und sitzt einer gleichmäßig verlaufenden Basallamina (BL) auf. Im basalen Zytoplasma sind vereinzelt Lymphozyten (Pfeil) zu finden. L.p.= Lamina propria

C: Die Lamina propria (L.p.) stellt sich faser- und zellarm dar. Zwischen den einzelnen Zellen und Fasern bilden sich weite Interzellularspalten aus. Epithel = E

D: Im Eileiterepithel (E) des Isthmus sind die Zilienzellen weniger gut von den sekretorischen Zellen zu unterscheiden. Apikal sind nur vereinzelte Protrusionen detektierbar. L.p.= Lamina propria

E: Die im nicht mehr gänzlich erhaltenen Bindegewebe (L.p.) liegenden Gefäße (Pfeil) lassen sich gut darstellen. Epithel = E

F: Die Falten im Epithel (E) des Isthmus zeigen keine Verzweigungen. L.p.= Lamina propria

#### 4.1.1.3 Histomorphologische Befunde am Eileiter des Rindes am Tag 4

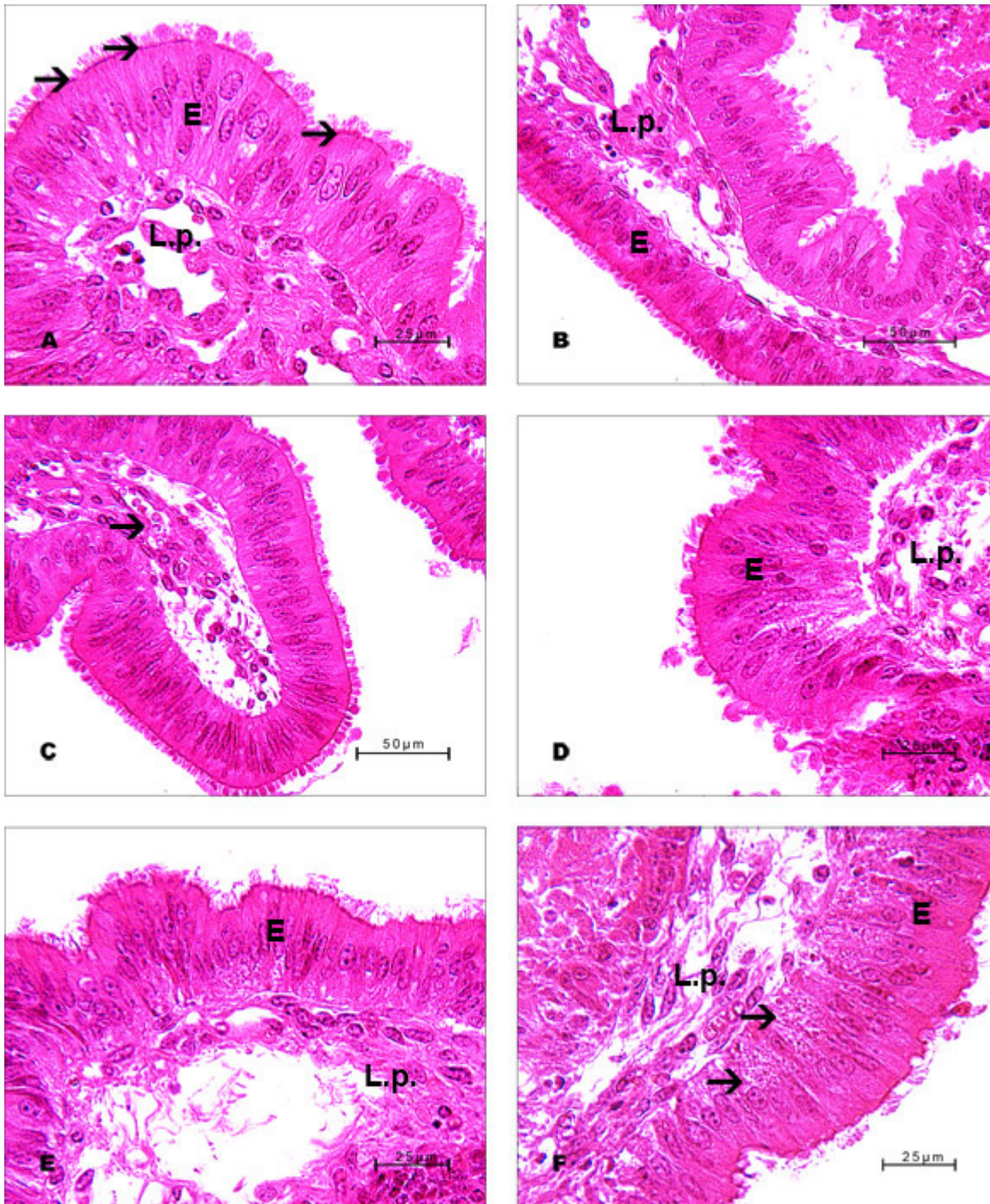
Tag 4: Die Lamina propria ist in der Ampulla und im Isthmus locker, zellarm und die Bindegewebsfasern sind locker angeordnet. Die Gefäße in ihr sind gut erhalten. Die Lamina epithelialis besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen sind gut erhalten. Die sekretorischen Zellen weisen Protrusionen auf. Einige von ihnen enthalten Kerne. Einige Zilienzellen enthalten helle Vakuolen. In beiden Segmenten, Ampulla und Isthmus, sind Stiftchenzellen und Lymphozyten zu finden. Die Tunica muscularis ist in der Ampulla nicht gut von der Lamina propria abgrenzbar. Im Isthmus dagegen können longitudinal und zirkulär verlaufende glatte Muskelzellen differenziert werden. Die Gefäße in der Tela subserosa sind noch gut erhalten.

**Tab. 6 Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 4**

Lamina epithelialis	Epithelart	Einschichtig
	Zellform	Längsform
	Falten	Fächerförmig
	Basalmembran	Teilweise unterbrochen
	Mikrovilli	+ / ++
	Protrusionen	++
Zilienzellen (ZZ)	Zilien	++ / +++
	Zellform	Längsform und Vakuolen
	Zellkernlage	Basal bis apikal
	Zytoplasmafärbung	Hell
	Zellkern, -färbung	Oval, euchromatisch
Sekretorische Zellen (SZ)	Zellform	Becherform
	Zellkernlage	Basal bis mittig
	Zytoplasmafärbung	Dunkler als bei ZZ
	Zellkern, -färbung	Oval, heterochromatisch
Basalzellen (Lymphozyten)	Kleine, runde Zellen, mit heterochromatischen Kernen und wenig Zytoplasma	+ Basal im Epithel
Stiftchenzellen	Schmale Zellen mit stiftchenförmigen Kern, Kollabierte bzw. degenerierte Epithelzellen	+ / ++
Lamina propria	Locker bis sehr locker, Freie Zellen	++
Tunica muscularis	Längsschicht	Nicht immer gut differenzierbar Im Isthmus ist die Muskelschicht doppelt so breit, wie in der Ampulla
	Zirkulärschicht	
Gefäße	Gut erhalten	+ / ++ mit Blut
Schwämmchen	Vorhanden	Viele ausgewanderte Zellen, Zellgirlanden, Zellen in Mitose; Blutzellen

+ = wenig, ++ = gehäuft, +++ = viele





**Abb. 6** A, B, C: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 4.

D, E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 4.

A: Die Kerne der schmalen sekretorischen Zellen sind basal bis mittig im Zytoplasma positioniert. Im Gegensatz hierzu können die großen runden Kerne der zilientragenden Zellen im apikalen Zellabschnitt beobachtet werden. Desweiteren befinden sich unter der apikalen Zellmembran der zilientragenden Zellen Basalkörperchen (Pfeil). L.p.= Lamina propria, Epithel = E

B: Die Basallamina des Epithels (E) der Ampulla scheint teilweise unterbrochen und wird nur von wenig Bindegewebe unterlagert, welches zerrissen erscheint. L.p.= Lamina propria

C: Im Gegensatz zum Bindegewebe stellt sich das Epithel der Ampulla regelmäßig und geordnet dar. Die im Bindegewebe liegenden Gefäße (Pfeil) sind vollständig erhalten.

D: Die Mucosa (L.p.) im Isthmus bildet nur niedrige Primärfalten aus. Epithel = E

E: Innerhalb der Primärfalten des Isthmus sind die Zellen fächerförmig angeordnet. Die Primärfalten werden nicht von Bindegewebe (L.p.) unterlagert. Epithel = E

F: Innerhalb des basalen Zytoplasmas sind helle, körnige Bereiche (Pfeil) erkennbar. An der Oberfläche sind lange Kinozilien vorhanden. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

#### *4.1.1.4 Histomorphologische Befunde am Eileiter des Rindes am Tag 7*

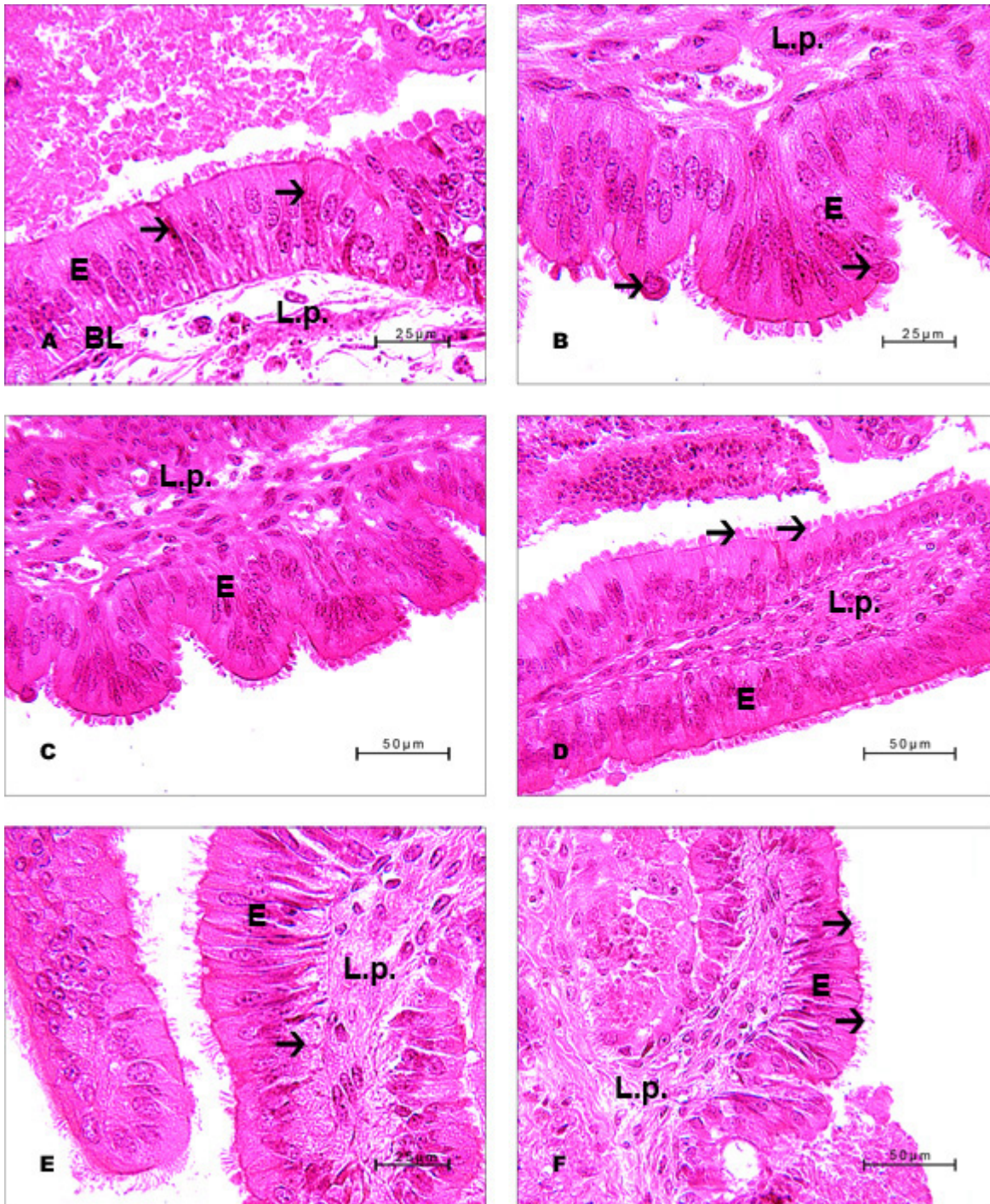
Tag 7: Die Lamina propria ist in der Ampulla und im Isthmus locker, zellarm und die Bindegewebsfasern weichen auseinander. Bei einigen Proben erscheint die Lamina propria aber noch kompakt. Bei anderen Proben sind nur Lamina propria und Lamina epithelialis vorhanden. Die Gefäße sind gut erhalten. Die Lamina epithelialis besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen sind relativ gut erhalten. Bei den sekretorischen Zellen können Protrusionen beobachtet werden. Einige von ihnen enthalten Kerne. Einige Zilienzellen weisen helle Vakuolen auf. In beiden Segmenten, Ampulla und Isthmus, sind Stiftchenzellen und Lymphozyten zu finden. In der Tunica muscularis sind die einzelnen Muskelschichten nicht mehr genau abgrenzbar. Die Tela subserosa variiert in ihrer Dicke. Die Gefäße in der Tela subserosa sind relativ gut erhalten.

**Tab. 7 Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 7**

Lamina epithelialis	Epithelart	Einschichtig bis mehrschichtig Verschiedene Epithelhöhe
	Zellform	Länglich
	Falten	Fächerförmig
	Basalmembran	Teilweise unterbrochen
	Mikrovilli	++
	Protrusionen	++
Zilienzellen (ZZ)	Zilien	++/ +++
	Zellform	Längsform + Vakuolen
	Zellkernlage	Basal bis apikal
	Zytoplasmafärbung	Hell
	Zellkern, -Färbung	Oval, euchromatisch
Sekretorische Zellen (SZ)	Zellform	Becherform
	Zellkernlage	Basal bis mittig
	Zytoplasmafärbung	Dunkler als bei ZZ
	Zellkern	Oval, heterochromatisch
Basalzellen (Lymphozyten)	Kleine, runde Zellen, mit heterochromatischen Kernen und wenig Zytoplasma	+ Basal im Epithel
Stiftchenzellen	Schmale Zellen mit stiftchenförmigem Kern Kollabierte bzw. degenerierte Epithelzellen	++
Lamina propria	Locker, zellarm, Bindegewebefasern gehen auseinander; bei einigen Proben erscheinen sie kompakt	+
Tunica muscularis	Längsschicht	Nicht immer gut erhalten Im Isthmus ist die Muskelschicht doppelt so breit, wie in der Ampulla
	Zirkulärschicht	
Gefäße	Sowohl in Lam. propria, als auch in Tunica muscularis und Subserosa Verschiedene Größen Erythrozyten auch vorhanden	+ mit Erythrozyten
Schwämmchen	Vorhanden	Viele ausgewanderte Zellen, Zellgirlanden, Zellen in Mitose; Blutzellen

+ = wenig, ++ = gehäuft, +++ = viele





**Abb. 7** A, B, C, D: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 7.

E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 7.

A: Die Epithelzellen am Tag 7 sind gut erhalten und polarisiert und sitzen auf einer ebenen Basallamina (BL) auf. Auffallend sind die sehr schmalen, dunklen, sekretorischen Zellen (Pfeil). L.p.= Lamina propria, Epithel = E

B: Die sekretorischen Zellen bilden zum Teil große, kernhaltige Protrusionen (Pfeil) aus. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

C: Die Primärfalten des Isthmus sind fächerförmig. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

D: Es sind zahlreiche Protrusionen (Pfeil) zu beobachten. Lamina propria (L.p.) sieht kompakt aus. Epithel = E



E: Im basalen Zytoplasma mancher Zellen sind vakuolenartige Bildungen (Pfeil) zu beobachten.

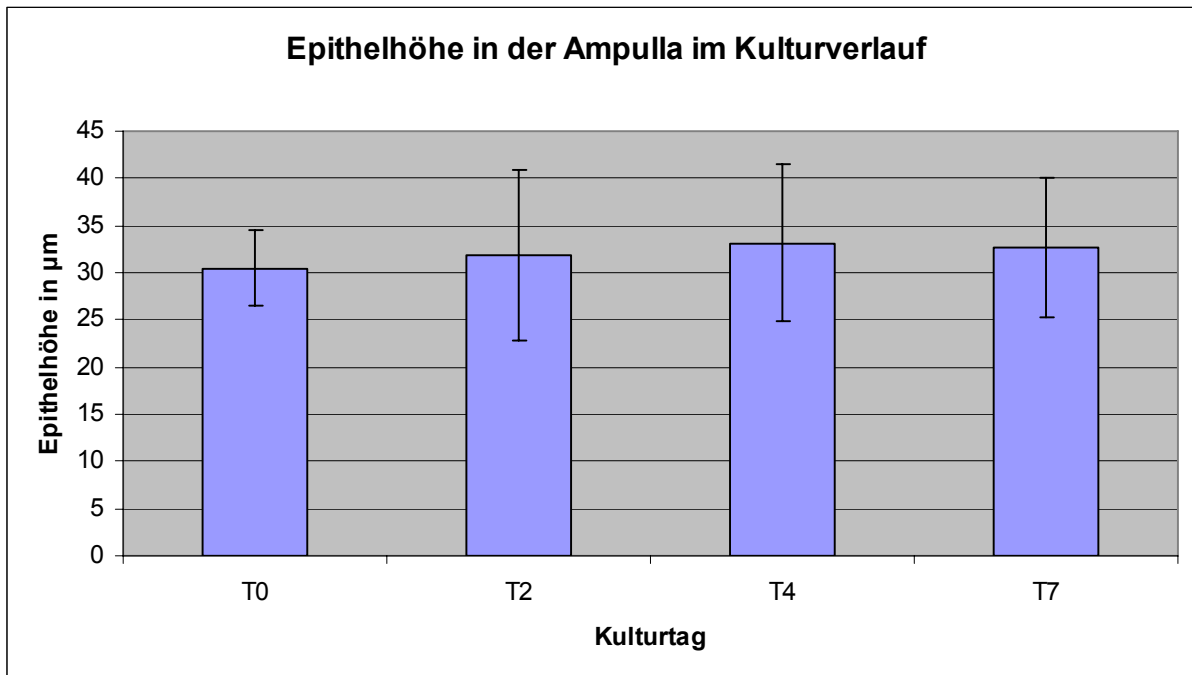
F: Die Zilien der Zilienzellen (Pfeil) stellen sich sehr gut dar. E = Epithel, L. p. = Lamina propria

#### *4.1.1.5 Morphometrische Untersuchungen am bovinen Eileiterepithel*

##### 4.1.1.5.1 Epithelhöhen des bovinen Eileiters

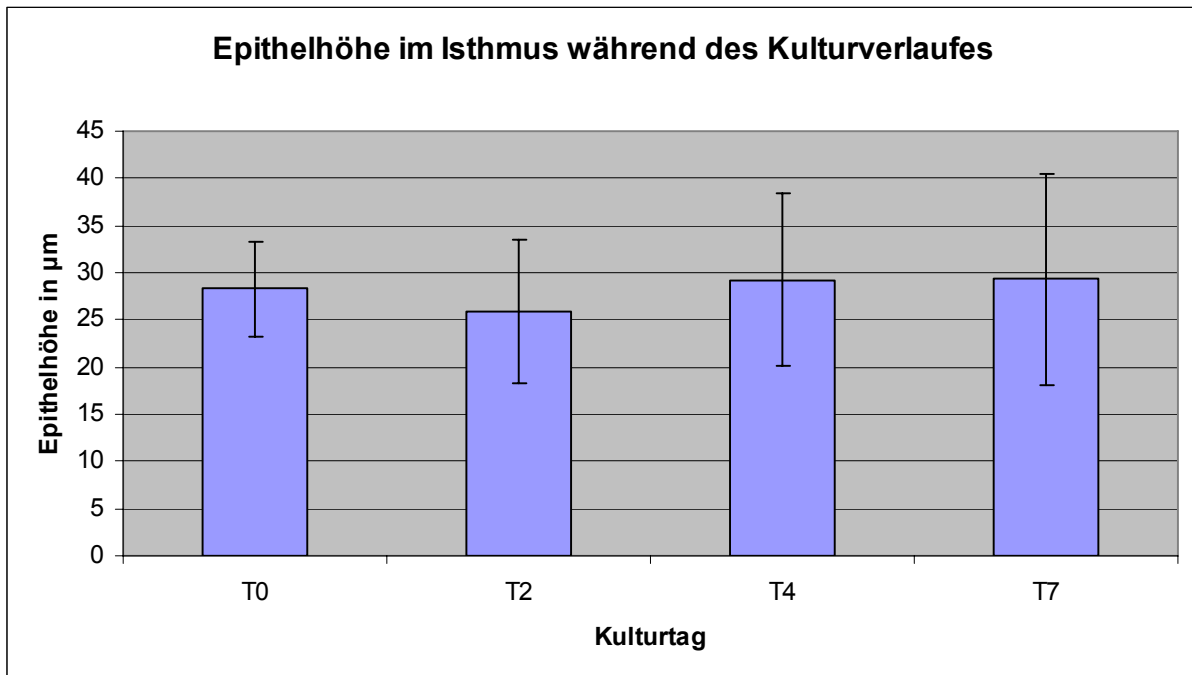
Die Höhe des Epithels von der Basallamina zur apikalen Zellmembran beträgt in der Ampulla am Tag 0 durchschnittlich 30,5  $\mu\text{m}$ , am Tag 2: 31,8  $\mu\text{m}$ , am Tag 4: 33,2  $\mu\text{m}$ , und am Tag 7: 32,8  $\mu\text{m}$ .

Im Isthmus ist das Epithel flacher als in der Ampulla. Die durchschnittliche Höhe der Epithelzellen beträgt am Tag 0: 28,3  $\mu\text{m}$ , am Tag 2: 25,9  $\mu\text{m}$ , am Tag 4: 29,2  $\mu\text{m}$  und am Tag 7: 29,3  $\mu\text{m}$ .



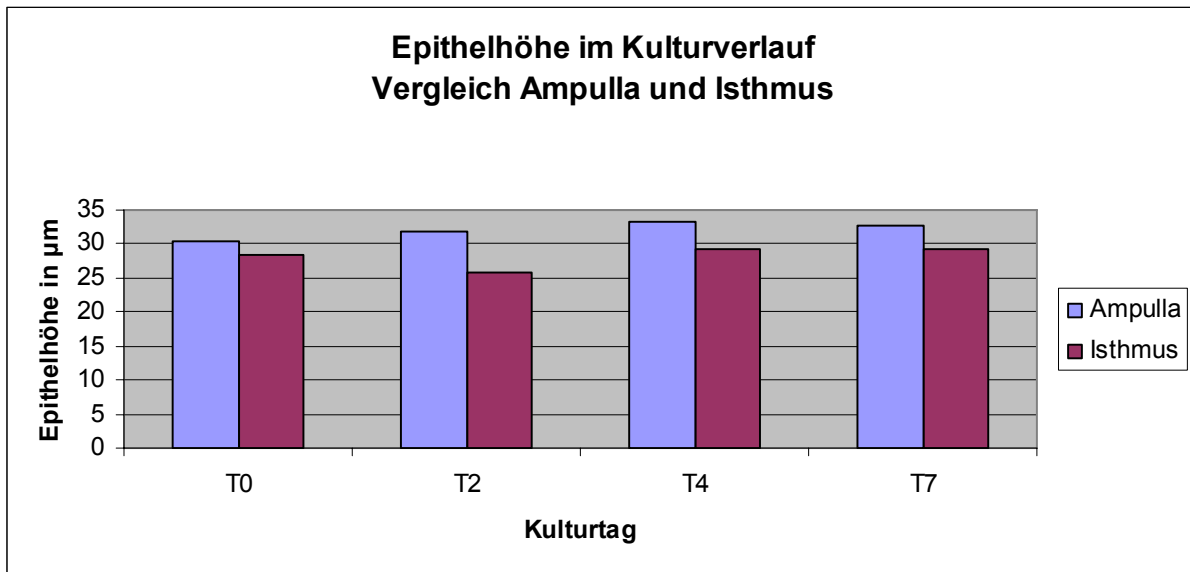
**Graphik 1: Die Höhe des Epithels in µm in der Ampulla im Kulturverlauf**

Die Höhe des Epithels in µm in der Ampulla an vier verschiedenen Kultivierungszeiten mit Standardabweichung. Es ist zu beachten, dass in der Kultur relativ große Variationen der Zellhöhe vorkommen.



**Graphik 2: Epithelhöhe in µm im Isthmus während der Kultur**

Die Höhen des Epithels in µm im Isthmus an vier verschiedenen Kultivierungszeiten mit Standardabweichungen. Es ist zu beachten, dass es in Kultur relativ große Variationen vorkommen.



**Graphik 3: Epithelhöhe im Kulturverlauf. Vergleich Ampulla und Isthmus**

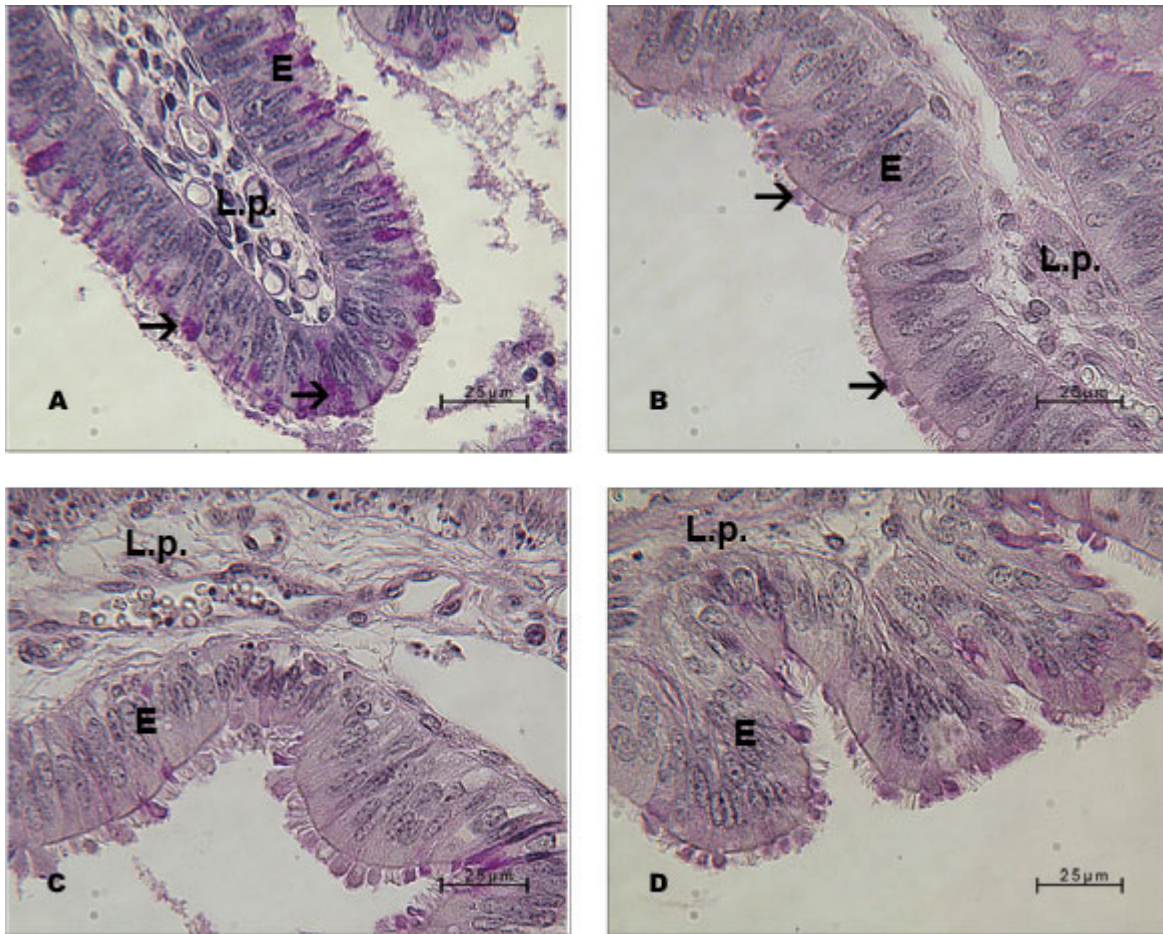
Die Epithelhöhe in der Ampulla und im Isthmus wurde zu vier verschiedenen Kultivierungszeiten gemessen. Das Epithel der Ampulla ist zu allen Kultivierungszeiten höher als das Epithel im Isthmus. Die höchsten Werte werden in beiden Segmenten am Tag 4, die niedrigsten Werte am Tag 0 gemessen.

#### 4.1.2 PAS-Färbung

Tag 0: Bei der PAS-Reaktion sind die apikalen Zytoplasmaanteile des Epithels etwa jeder zweiten Zelle angefärbt. Dabei handelt es sich um die Zellen mit basal gelegenem Kern, also um die sekretorischen Zellen. Die zilientragenden Zellen weisen in keiner der Proben eine positive PAS-Reaktion auf. Die basalen Zellen (Lymphozyten) verhalten sich ebenfalls PAS negativ (-). Ihr Zytoplasma erscheint noch heller als das der zilientragenden Zellen. In beiden untersuchten Segmenten ist die Färbung der sekretorischen Zellen deutlich positiv (++). Die PAS-Reaktion dehnt sich in den sekretorischen Ampullazellen bis in die Mitte des Zytoplasmas aus. Im Isthmus hingegen bleibt sie auf das apikale Zytoplasma begrenzt.

Am Tag 2 ist nur in einzelnen Proben eine sehr schwache positive (+) Reaktion zu sehen, die auf die apikale Zelloberfläche und einige Protrusionen beschränkt ist. Nach Amylasevorbehandlung fällt die PAS-Reaktion dort negativ (-) aus.

Am Tag 4 und Tag 7 ist in einzelnen Proben eine schwach positive (+) PAS-Reaktion zu beobachten. Sie ist in den sekretorischen Zellen, auf der Zelloberfläche und in einigen Protrusionen zu finden.



**Abb. 8** PAS-Reaktion in der Ampulla und im Isthmus Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D).

A: Am Tag 0 ist eine stark bis deutlich positive PAS-Reaktion im supranukleären Zytoplasma der sekretorischen Zellen (Pfeil) zu beobachten. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

B: Am Tag 2 ist die Reaktion nur in vereinzelten Zellen und manche Protrusionen (Pfeil) undeutlich positiv.

C: Am Tag 4 sind einige Zellen und Protrusionen deutlich positiv. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

D: Das Bild am Tag 7 entspricht dem von Tag 4. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

#### 4.1.3 Trichromfärbung nach Masson und Goldner

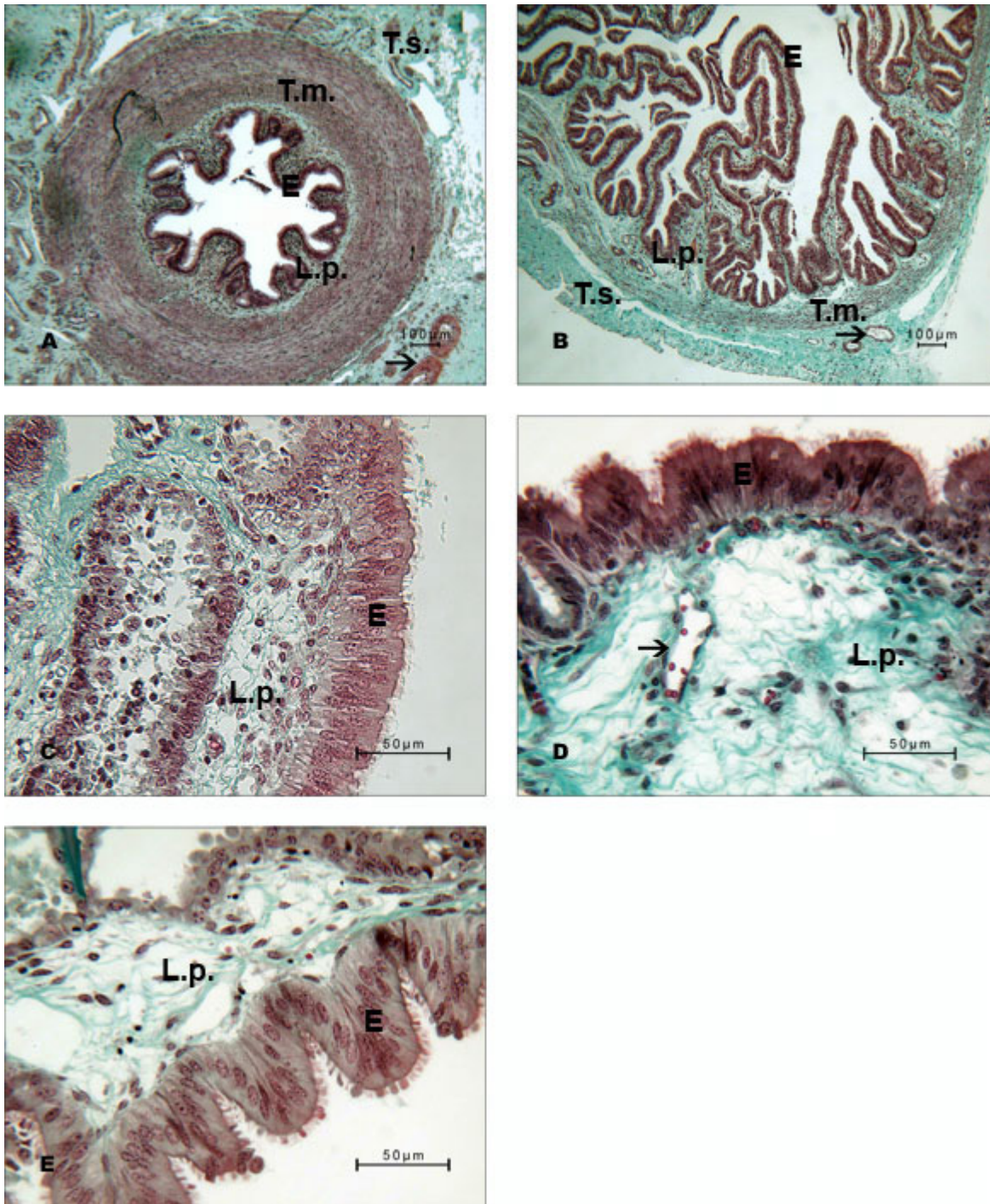
Tag 0: Die Tela subserosa ist eine bindegewebige Schicht, reich an Grundsubstanz und zellarm. Sie ist in der Ampulla sehr schmal und im Isthmus breit ausgebildet. In dieser Schicht sind Arterien und Venen eingelagert. Die Tunica muscularis ist in den verschiedenen Segmenten des Eileiters unterschiedlich dick. Im Isthmus ist sie circa dreimal breiter als in der Ampulla. In der Mitte der Tunica muscularis liegt eine zirkuläre Schicht glatter Muskelzellen vor. Die Dicke der Muskelschicht nimmt in Richtung Infundibulum deutlich ab. Die zellreiche Lamina propria ist im Isthmus ebenfalls etwas dicker als in der Ampulla ausgebildet. In der Lamina propria der Ampulla befinden sich zahlreiche weitleumige Kapillaren, die bis in die Spitzen der Falten ziehen. Im Isthmus nimmt ihr Durchmesser ab.

Tag 2: Die Gefäße in Tela subserosa sind gut erhalten geblieben. Die Schichten der Tunica muscularis sind in der Ampulla nicht mehr klar abgrenzbar. Im Isthmus dagegen können die longitudinale und die zirkuläre Schicht noch gut unterschieden werden. Die Lamina propria erscheint in der Ampulla locker und zellarm. Im Isthmus ist sie deutlich kompakter.

Tag 4: Die Tela subserosa ist eine zellarme Schicht. Sie ist im Isthmus besser erhalten als in der Ampulla. Die Gefäße in der Tela subserosa sind gleichfalls gut erhalten. Bei Proben aus der Ampulla können in der Tunica muscularis die Längs- und Zirkulärschicht nicht gut voneinander differenziert werden. Im Unterschied dazu sind sie im Isthmus noch relativ gut abgrenzbar. Die Lamina propria ist sowohl in der Ampulla als auch im Isthmus locker, zellarm und enthält ein lockeres Netz von Bindegewebsfasern.

Tag 7: Bei den einzelnen Explantaten variiert die Dicke der Tela subserosa deutlich. Die Gefäße sind in der Schicht relativ gut erhalten. An der Ampulla und im Isthmus sind die einzelnen Muskelschichten nicht mehr klar abgrenzbar. Die Lamina propria ist in beiden Segmenten locker und zellarm.





**Abb. 9** Goldner-Färbung, Ampulla und Isthmus am Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 7.

A: Isthmus, Tag 0: Die Tunica muscularis (T.m.) erscheint kompakt, es ist wenig Bindegewebe eingelagert. Epithel (E), Lamina propria (L.p.), Tela subserosa (T.s.), Gefäß (Pfeil); B: Ampulla, Tag 0: Die Tunica muscularis (T.m.) erscheint locker und ist reich an Bindegewebe. In der Tela subserosa (T.s.) sind relativ große Gefäße (Pfeil) eingelagert. Epithel (E), Lamina propria (L.p.);

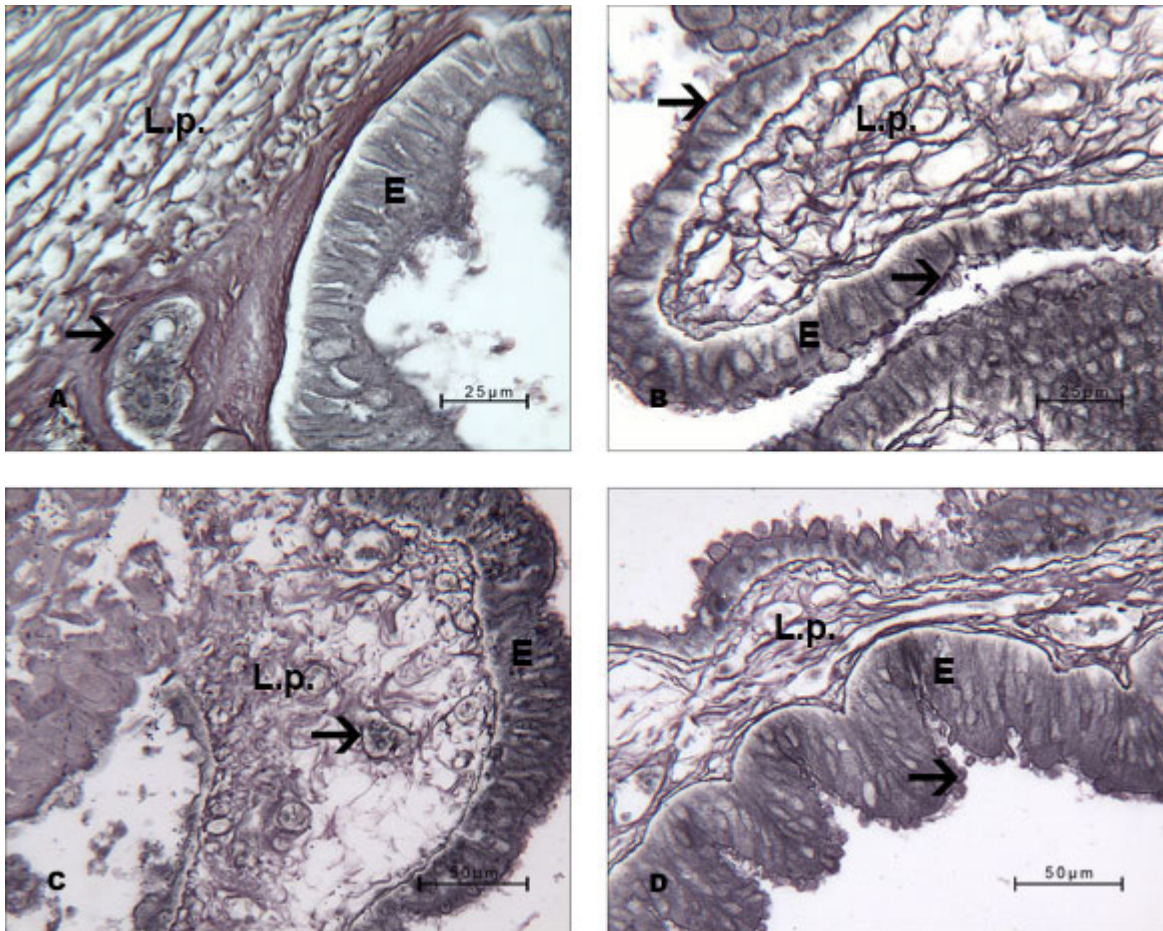
C: Ampulla, Tag 2: (E), Lamina propria (L.p.) erscheint locker.

D: Ampulla, Tag 4: (E), Lamina propria (L.p.) erscheint locker, Gefäß (Pfeil);

E: Ampulla, Tag 7: (E), Lamina propria (L.p.) erscheint locker.

#### 4.1.4 Silberimprägnierung nach Gomori

Die Basallamina bleibt während der gesamten Kulturdauer gut erhalten. Sie stellt sich als schwarze linienformige Struktur unter den Epithelzellen dar. Die Epithelzellen färben sich dunkelgrau. Gut zu erkennen sind an der apikalen Oberfläche die Kinetosomen der Zilienzellen. Die Zilien erscheinen dunkelgrau. Sie sind gut erkennbar und erlauben die leichte Differenzierung zwischen Zilienzellen und sekretorischen Zellen. Die Lamina propria ist dunkelviolettfärbt. Am Tag 0 lassen sich deutlich die parallel verlaufenden Kollagenfasern erkennen. Im Kultur stellt sich die Lamina propria zell- und faserarm dar. Die Tunica muscularis enthält viele feine retikuläre Fasern in den bindegewebigen Verschiebschichten um die Muskelzellen. Die größeren Gefäße der Tela subserosa weisen auch silberimprägnierte Fasern zwischen ihren glatten Muskelzellen auf. Ansonsten erscheint diese Schicht homogen violett. Ihre Farbintensität ist schwächer als die der Lamina propria. Die Gefäße und Nervenbündel scheinen während der gesamten Kulturdauer gut erhalten zu bleiben.



**Abb. 10** Silberimprägnation nach Gomori, Ampulla, am Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D).

- A: Deutlich zu sehen sind die parallel verlaufende Kollagenfasern in der Lamina propria (L.p.). Ein großes Gefäß (Pfeil) befindet sich in der Lamina propria. Epithel = E
- B: Am Tag 2 sind die Kinetosomen der Zilienzellen sehr gut dargestellt (Pfeil). Die Lamina propria (L.p.) erscheint locker und faserarm. Epithel = E
- C: Die Lamina propria (L.p.) erscheint faserarm. Ein Nerv (Pfeil) ist in der Lamina propria zu beobachten. Epithel = E
- D: Am Tag 7 sind zahlreiche Protrusionen (Pfeil) zu beobachten. Die Kinetosomen der Zilienzellen stellen sich schwarz dar. L.p.= Lamina propria, Epithel = E



#### 4.1.5 Alcianblau-Färbung

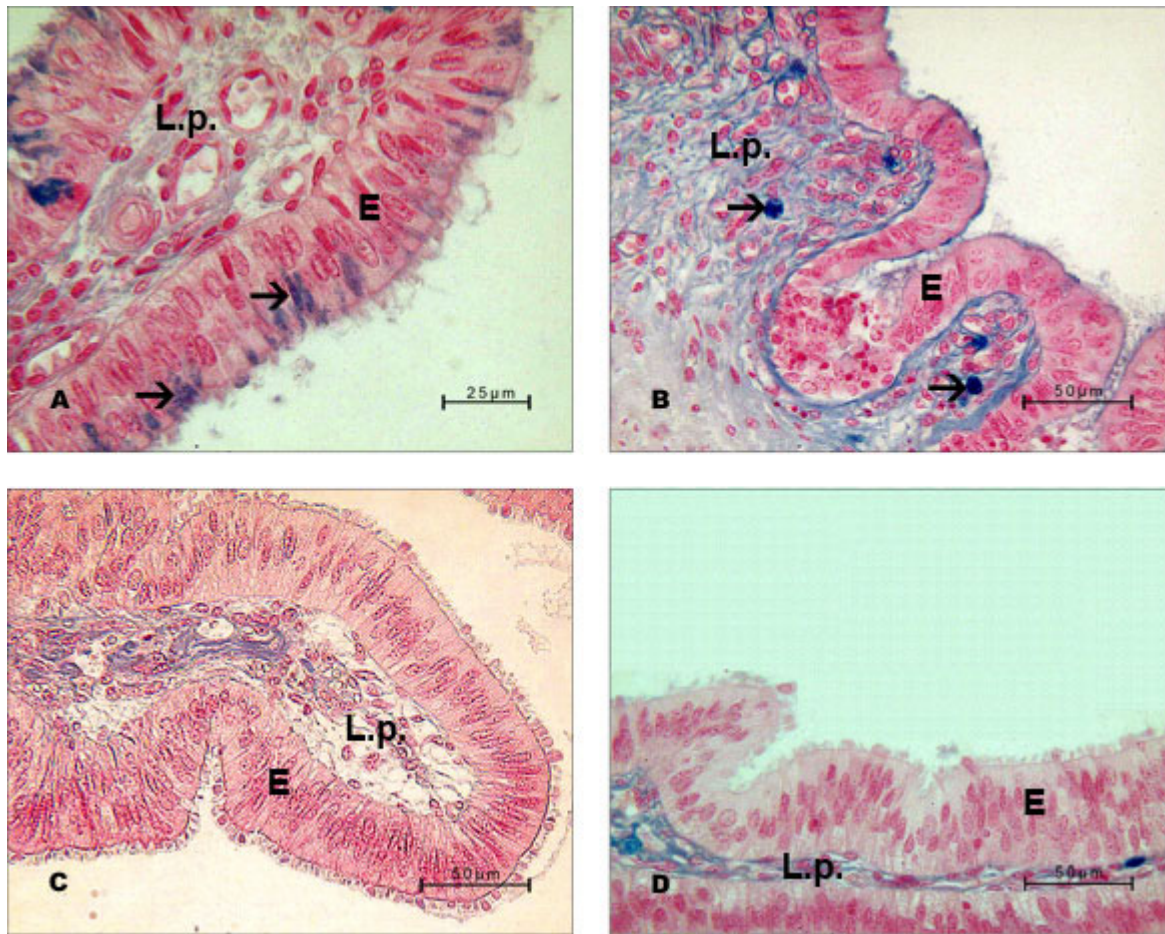
Die Proben stammen von Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 7 von ipsi- und contralateralen Ampulla- und Isthmussegmenten. Bei Durchführung der Färbung bei einem pH-Wert von 1,0 ist bei den Proben von Tag 0 in den apikalen Teilen der sekretorischen Zellen und auch in den apikalen Protrusionen eine schwache hellblaue Färbung zu beobachten. Dies weist auf sulfatierte Mukosubstanzen in dieser Lokalisation hin. Am Tag 2 beschränkt sich die Färbung auf die Zelloberfläche und die Zilien. Am Tag 4 und Tag 7 ist keine Reaktion mehr zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 2,5 ist die Reaktion am Tag 0 intensiver. In der Ampulla können damit carboxylgruppenhaltige Mukosubstanzen im supranukleären Zytoplasma von sekretorischen Epithelzellen nachgewiesen werden. Auch die Protrusionen weisen mit Alcianblau eine blaue Färbung auf. Die Alcianblaureaktion in den einzelnen Proben ist nur bei einigen Zellen gut zu erkennen und fällt teilweise schwach aus. Am Tag 2, 4 und 7 ist nur eine schwache hellblaue Färbung der Zilien vorhanden.

**Tab. 8 Alcianblau Färbung am bovinen Eileiter**

Kulturdauer	Alc. pH = 1,00	Alc. pH = 2,5
Tag 0	Färbung im apikalen Teil der SZ, Protrusionen, Zilien, Subserosa, Bgw. sind negativ.	Färbung im apikalen Teil der SZ, Protrusionen, Zilien, Bdgw. neg. Amp. + Isth. gleichermaßen gefärbt Färbung stärker als Alc. 1,00
Tag 2	Färbung nur im Bgw. ++; Zilien, BL	Färbung nur im Bgw. +/++; Zilien++, BM
Tag 4	Bgw.++, Zilien, -/+, BL	Bgw.+/++, Zilien++, BM
Tag 7	Nur Bgw. ++. Zilien neg.	Bgw.+/++, Zilien++, BM

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; Lamina propria = Lamina propria; T. muscularis = Tunica muscularis; Bgw. = Bindegewebe; BL = Basallamina



**Abb. 11** Alcianblaufärbung bei pH 2, 5, Ampulla, am Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D).

A: Am Tag 0 ist weist das supranukleäre Zytoplasma (Pfeil) der sekretorischen Zellen eine deutliche Färbung auf, die Zilien sind ebenfalls angefärbt. L.p.= Lamina propria, Epithel = E  
 B: Am Tag 2 zeigen die Zilien eine schwach positive Reaktion. Die Lamina propria (L.p.) ist deutlich positiv gefärbt. Es sind auch einige intensiv blau gefärbte Zellen (Pfeil), bei denen es sich um Lymphozyten handelt, zu beobachten. Epithel = E  
 C, D: Am Tag 4 und Tag 7 zeigt Lamina propria (L.p.) eine schwache bis deutlich positive Reaktion. Das Eileiterepithel (E) ist negativ.

## **4.2 Immunhistochemische Untersuchungen am Eileiter des Rindes**

### **4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors alpha (ER $\alpha$ )**

Die Expression des ER im Eileiter lässt sich hauptsächlich in den Zellkernen der sekretorischen Zellen des Epithels nachweisen. Die Kerne der Fibrozyten der Lamina propria und der glatten Muskelzellen der Tunica muscularis sind schwach positiv. Bei Negativkontrollen bleiben die Zellkerne vollständig ungefärbt.

#### *4.2.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors alpha (ER $\alpha$ ) in der Ampulla*

In der Ampulla sind die Kerne der glatten Muskelzellen im Metöstrus negativ für ER $\alpha$ . Nur in zwei Proben zeigte sich eine schwach positive (+) Reaktion. Die Fibrozytenkerne der Lamina propria weisen selbst innerhalb einer Probe große Unterschiede auf. Es sind zwischen 15 und 30% der Kerne ER $\alpha$ -positiv. Auffallend oft liegen die immunpositiven Kerne in der unmittelbaren Nähe des Epithels. Ihre Reaktion ist im Metöstrus durchschnittlich schwach positiv (+). Am Tag 7 zeigen 2 Proben deutlich positiv reagierende Bindegewebszellkerne. Am Tag 2 und Tag 4 ist eine negative bis schwach positive Reaktion in den Kernen der Zellen im Lamina propria zu verzeichnen. Die Zellkerne der Tela subserosa sind während der ganzen Kulturdauer ER $\alpha$ -negativ. In den Endothelien lässt sich ER $\alpha$  nicht nachweisen. Insbesondere im Epithel variiert die Reaktionsintensität mit dem Antikörper gegen ER $\alpha$  in den Eileiter-abschnitten und während der untersuchten Kulturzeiten. Es ist sehr auffällig, dass sich in beiden Abschnitten, Ampulla und Isthmus, die Zellkerne der verschiedenen Zellen in ihrer Reaktionsintensität unterscheiden. Die basal lokalisierten Kerne der sekretorischen Zellen weisen im allgemeinen deutlich stärkere ER $\alpha$ -Reaktionen auf, als die in der Zellmitte gelegenen Kerne der Zilienzellen. Die basalen Zellen im Epithel sind immer ER $\alpha$ -negativ.

Im Metöstrus variiert die Lage der Kerne und ihre Reaktionsintensität auf ER $\alpha$ . Es sind einige stark positive Kerne vorhanden (+++), die eine ovale Form haben. Die basal gelegenen, ovalen Kerne reagieren unterschiedlich, von vollständig negativ bis stark ER $\alpha$ -positiv (+++). Die ehemals in der Zellmitte gelegenen Kerne der Zilienzellen sind an ihrer runden Form zu iden-

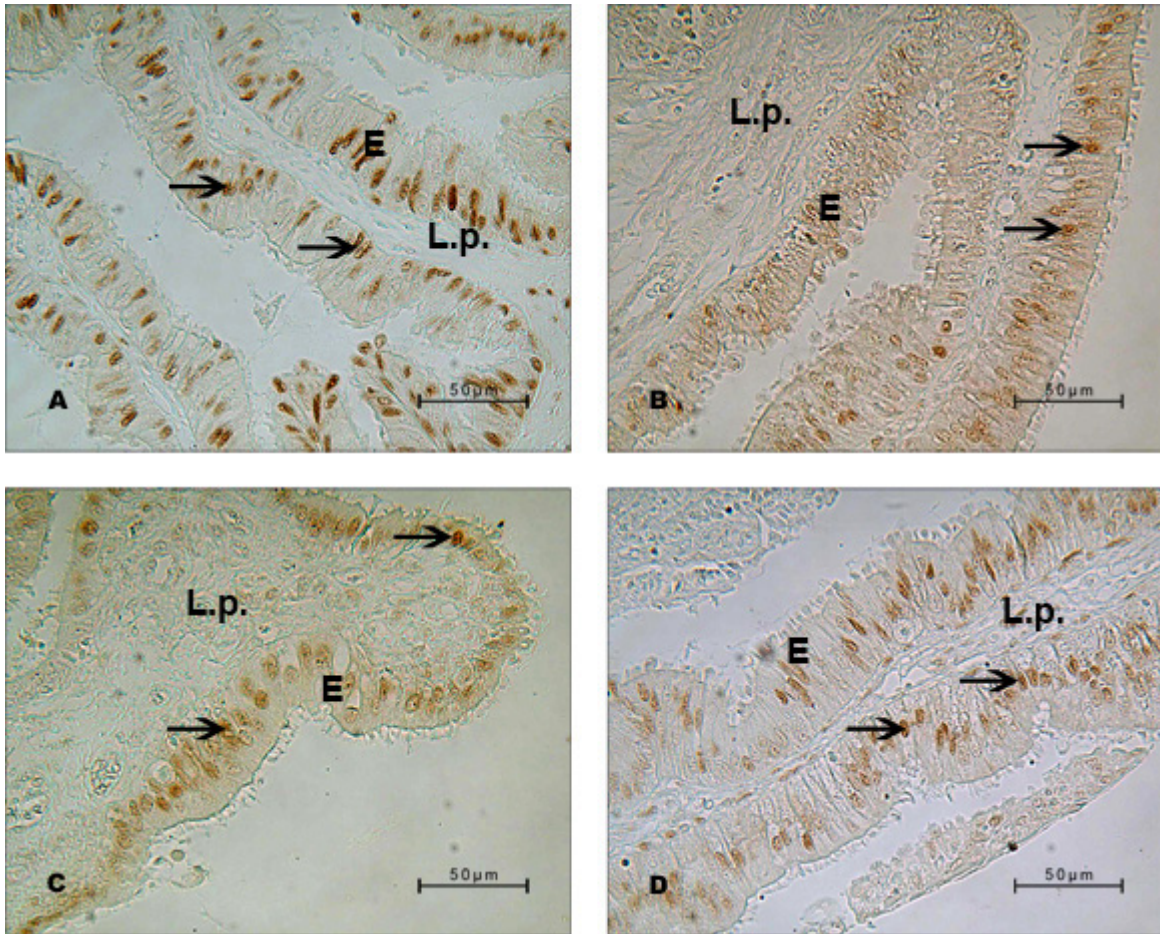
tifizieren. Sie erscheinen oft negativ und selten schwach (+) bis deutlich (++) positiv. In den Protrusionen von den sekretorischen Zellen befinden sich auch z.T. deutlich (++) bis stark (+++) positive Zellkerne.

**Tab. 9 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors ( ER ) in der Ampulla**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	+	+	+	+
SZ	++/+++	+	+/++	++
BZ	-	-	-	-
L. propria	+	-/+	-/+	-
T. muscularis	-	-	-	-
Subserosa	-	-	-	-
Serosa	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria;  
T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 12** Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors in der Ampulla des bovinen Eileiters.

A: Tag 0; Die basale Kernreihe (sekretorische Zellen) zeigt eine deutlich bis starke Reaktion (Pfeil). Die Kerne der zilientragenden Zellen zeigen eine schwach positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper. Es finden sich auch kernhaltige Protrusionen die stark positiv reagieren.

L.p. = Lamina propria, Epithel = E

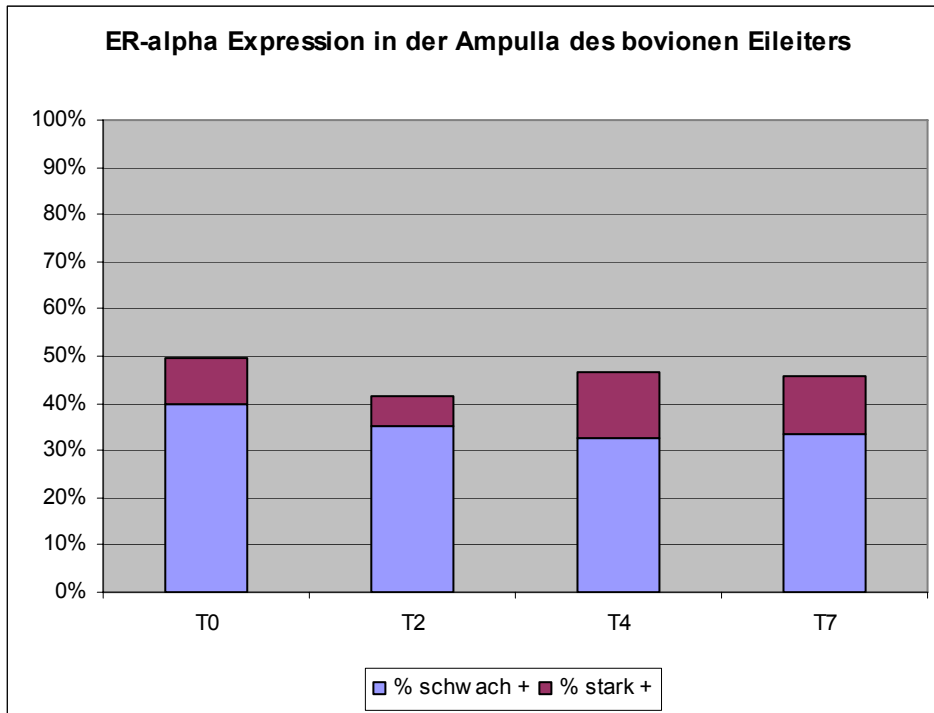
B: Am Tag 2 ist die Reaktion mit ER $\alpha$  am schwächsten. Lediglich die basale Kernreihe (sekretorische Zellen) zeigt eine positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper (Pfeil). L.p. =

Lamina propria, Epithel = E

C: Tag 4; Die Kerne der sekretorischen Zellen weisen deutlich immunpositive Kerne auf (Pfeil). In der Lamina propria befinden sich schwach positive Kerne. L.p. = Lamina propria, Epithel = E

D: Tag 7; Die stark positive Kerne (Pfeil) liegen am Tag 7 eher mittig. Basal liegende Kerne sind oft negativ. Auch im Lamina propria sind deutlich positive Zellen zu beobachten. L.p. = Lamina propria, Epithel = E





**Graphik 4: ER $\alpha$ -Expression in der Ampulla des bovinen Eileiters**

Graphische Darstellung der Anteile ER $\alpha$  positiver und stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla. Anhand der Graphik wird deutlich, dass sowohl der maximale Anteil an Zellkernen, die ER $\alpha$  exprimieren als auch die maximale Expression des ER $\alpha$  in der Ampulla am Tag 0 gegeben ist. Am Tag 2 ist sowohl der Anteil aller positiv reagierenden Zellen als auch der stark positiv reagierenden Zellen (++) am niedrigsten. Am Tag 0 ist der Anteil ER $\alpha$ -positiver Zellen am höchsten und am Tag 2 am geringsten.

#### 4.2.1.2 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors alpha (ER $\alpha$ ) im Isthmus

Die Proben aus dem Isthmussegment weisen in Muskulatur und Bindegewebe im Metöstrus eine deutlich (++) bis stark (+++) positive Reaktion der Zellkerne mit dem Antikörper gegen ER $\alpha$  auf. In der Kultur wird die Reaktion schwächer. Die Serosa ist teilweise schwach ER $\alpha$ -positiv. Die Gefäße weisen keine Reaktion auf.

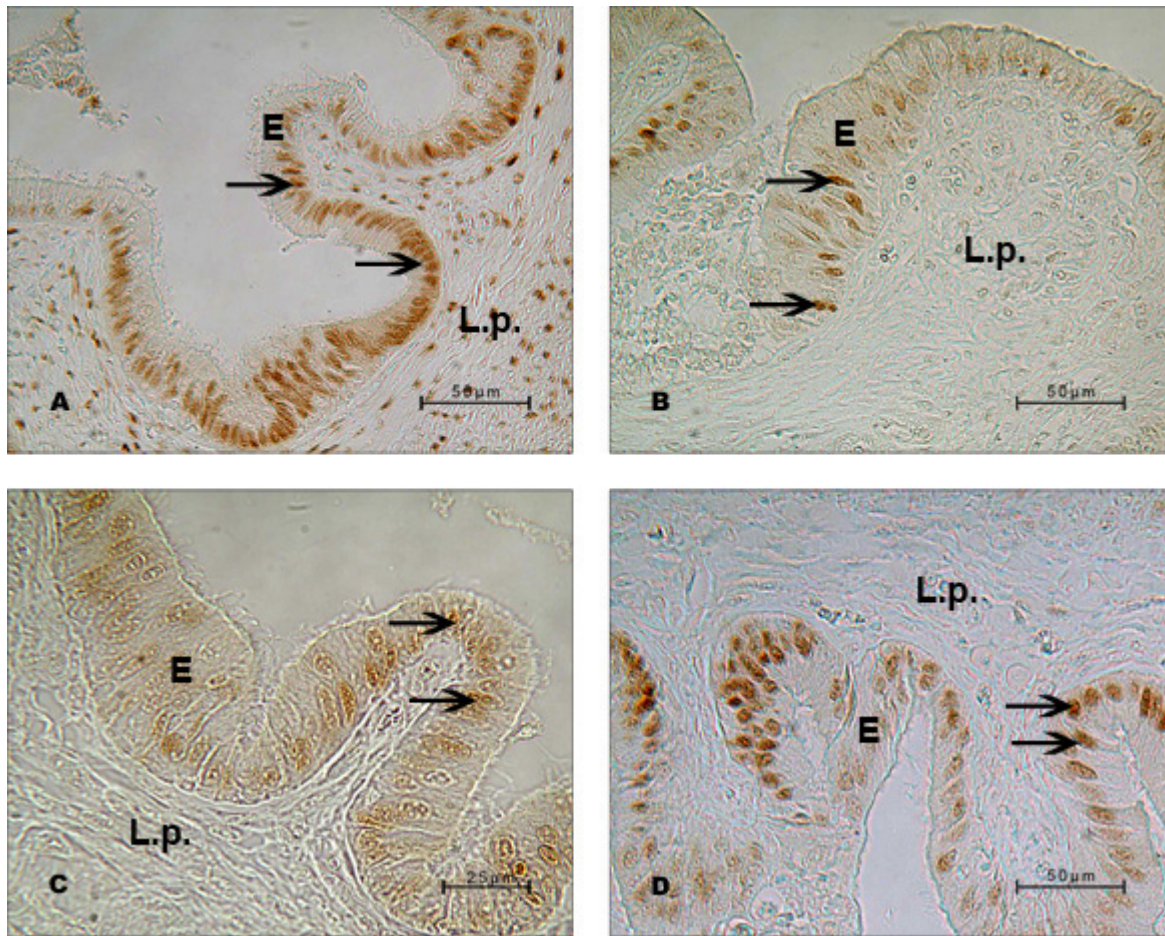
Im bovinen Eileiterepithel ist die Intensität der ER $\alpha$ -Immunreaktion im Isthmus stärker als in der Ampulla. Am Tag 0 ist die basale Kernreihe der sekretorischen Zellen fast durchgängig stark ER $\alpha$ -positiv (+++). Die in der Mitte der Zelle gelegenen Kerne der Zilienzellen sind durchschnittlich deutlich positiv (++) . Am Tag 2 in der Kultur ist die Expression des Rezeptors wie in der Ampulla am geringsten. Es sind nur wenige, stark positive (+++) Kerne vorhanden. Die Anzahl der deutlich positiv gefärbten Kerne (++) scheint etwas höher zu sein als in der Ampulla. Am Tag 4 ist die basale Kernreihe der sekretorischen Zellen nicht ganz so stark ER $\alpha$ -positiv (++) wie am Tag 0. Zudem sind die in der Zellmitte gelegenen, ovale Kerne der Zilienzellen nur schwach (+) ER $\alpha$ -positiv gefärbt. Am Tag 7 sind wenige stark positive (+++) basal gelegene Kerne zu finden. Die ER $\alpha$ -Immunreaktion der basalen Kernreihe ist auch da stärker als die der in der Epithelmitte gelegenen Kerne. Die Tendenz der Expression der ER $\alpha$  ist absteigend von Tag 0 zu Tag 7.

**Tab. 10 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors ( ER ) im Isthmus**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	+	+	+	+
SZ	+++	++	++	++
BZ	-	-	-	-
L. propria	++	-	-	-
T. muscularis	++	-	-	-
Subserosa	+	-	-	-
Serosa	+	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria; T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 13** Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors im Isthmus des bovinen Eileiters.

A: Tag 0: Die Kerne der sekretorischen Zellen zeigen eine deutlich bis starke Reaktion (Pfeil). Die Kerne der zilientragenden Zellen zeigen eine schwach positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper. L.p. = Lamina propria, Epithel = E

B: Am Tag 2 ist die Reaktion mit ER $\alpha$  am schwächsten. In der basale Kernreihe findet sich eine positive Reaktion mit dem ER $\alpha$  Antikörper (Pfeil).

C: Tag 4: Die Kerne der sekretorischen Zellen (Pfeil) weisen deutlich immunpositive Kerne auf. Die Lamina propria zeigt keine Reaktion mit ER $\alpha$ . L.p. = Lamina propria, Epithel = E

D: Tag 7: Die stark positiven Kerne (Pfeil) liegen am Tag 7 basal. Die Lamina propria (L.p.) ist negativ. Epithel = E

#### 4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR)

Der Antikörper gegen den PR bindet spezifisch in den Zellkernen des Epithels, den Fibrozyten in der Lamina propria und der Tunica muscularis. Den größten Anteil positiver Zellen weist das Epithel des Eileiters auf. Die Intensität der Immunreaktion ist jedoch meistens in den Fibrozyten der Lamina propria stärker. Die Reaktionstärke des Epithels variiert während der Kultur und in den beiden untersuchten Abschnitten. In der Ampulla ist die immunhistochemische Reaktion wesentlich schwächer als im Isthmus. In beiden Abschnitten reagieren die in der Mitte des Epithels lokalisierten Kerne schwächer immunpositiv als die basal gelegenen. In den einzelnen Proben bestehen deutliche Unterschiede in der Expression von PR.

##### *4.2.2.1 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) in der Ampulla*

In der Ampulla ist die Expression des PR am Tag 0 am stärksten. Die Kerne der glatten Muskelzellen zeigen nur sehr schwache (+) oder keine (-) Immunreaktion auf PR. In der Tela subserosa kommen schwach positive (+) Kerne vor. Die meisten Zellen verhalten sich hier aber PR-negativ. Die Serosaepithelzellkerne sind teilweise schwach positiv (+). Einige Gefäße weisen deutlich (++) PR-positive Reaktion auf, während andere Gefäße gänzlich negativ erscheinen. Im Epithel der Ampulla sind am Tag 0 die basal gelegenen Kerne deutlich oder stark positiv (++)/+++ gefärbt. Es sind circa 45% der Zellkerne positiv, davon 10-15% stark positiv. In der Kultur zeigt sich eine deutlich absteigende Tendenz der positiven Reaktion mit PR.

**Tab. 11 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) in der Ampulla**

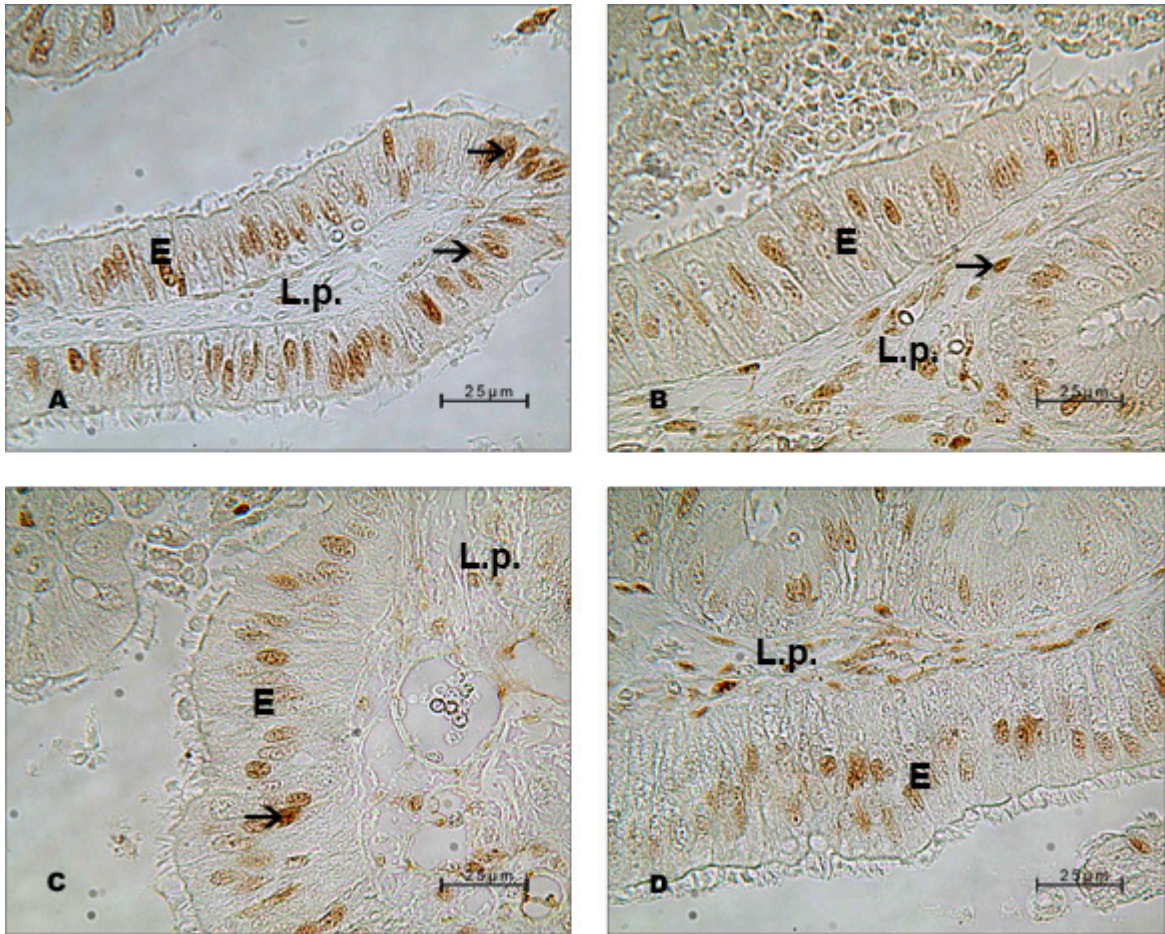
	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	+	+	+	+
SZ	++	++	++	++
BZ	-	-	-	-
L. propria	++	++	++	+/++
T. muscularis	-	-	-	-
Subserosa	+	-/+	-	-
Serosa	-/+	-/+	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	+	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria;

T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina





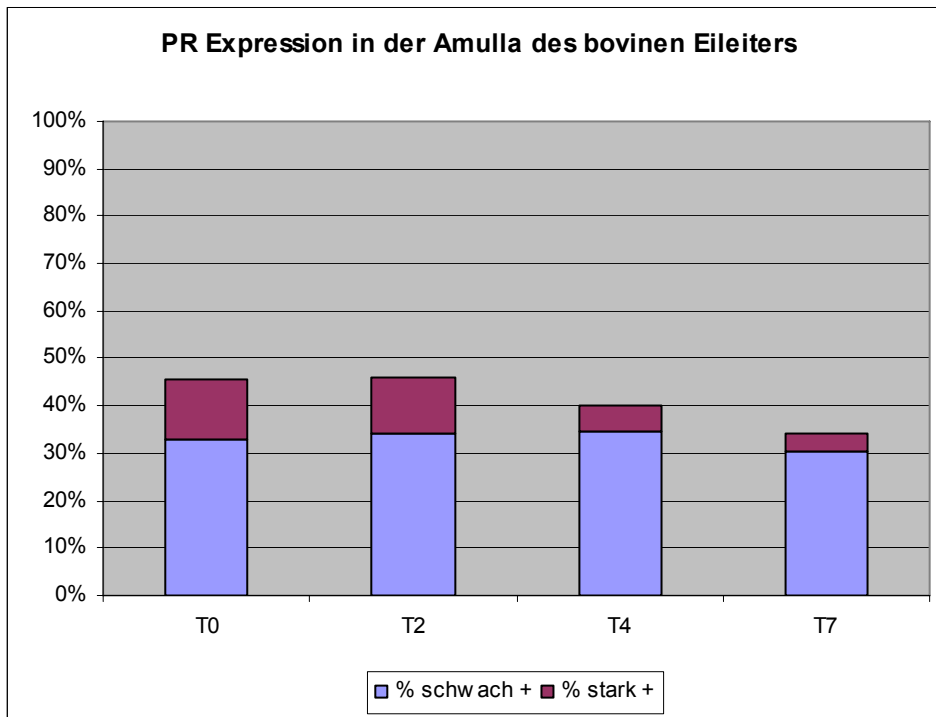
**Abb. 14** Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors in der Ampulla des bovinen Eileiters

A: Tag 0: Einige stark PR immunpositive Zellkerne befinden sich sowohl in der basalen Kernreihe, als auch in der Epithelmitte (Pfeile). L.p. = Lamina propria, Epithel = E

B: Tag 2: Die positive Reaktion ist schwächer im Vergleich zu Tag 0. Im Lamina propria (L.p.) befinden sich einige deutlich bis stark positive Zellkerne (Pfeil). Epithel = E

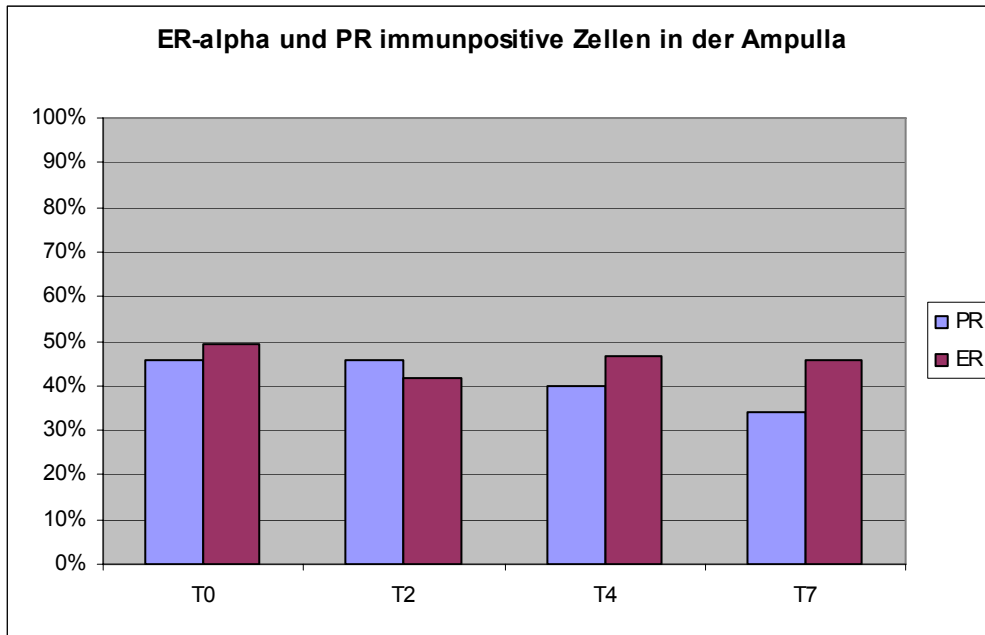
C: Tag 4: Die positive Zellkerne (Pfeil) liegen hier mittig. L.p. = Lamina propria, Epithel = E

D: Tag 7: Die Intensität der Färbung ist in der Lamina propria (Pfeil) stärker als im Epithel (E).



**Graphik 5: PR-Expression in der Ampulla des bovinen Eileiters**

Graphische Darstellung der Anteile PR-positiver und -stark positiver Zellen im Epithel der Ampulla. Die Gesamtanzahl positiver Zellen ist am Tag 0 und Tag 2 gleich, mit einer abnehmenden Tendenz zum Tag 7 hin.



**Graphik 6: ER $\alpha$ - und PR-immunpositive Zellen in der Ampulla**

Graphische Darstellung der Anteile positiver Zellen (+ und ++) für ER $\alpha$  und PR in der Ampulla zu vier verschiedenen Kulturzeitpunkten.



#### 4.2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) im Isthmus

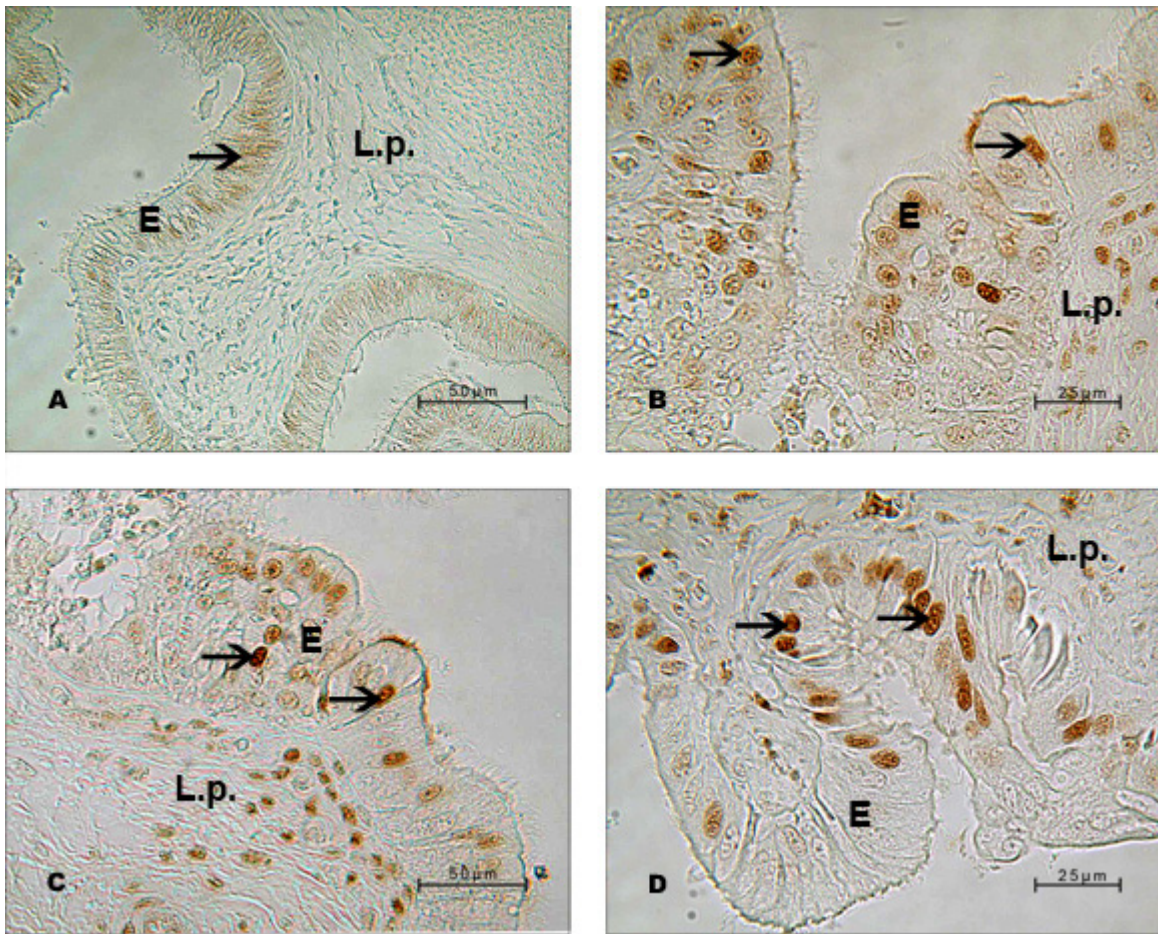
Im Isthmus ist die Expression des PR in den Zellkernen der Lamina propria deutlich (++) bis stark (+++) positiv. Die Kerne der glatten Muskelzellen zeigen eine schwach (+) bis deutlich (++) positive Reaktion mit dem Antikörper. Der PR lässt sich in den Endothelien der Gefäße nicht nachweisen. Der Rezeptorgehalt in der Serosa ist sehr unterschiedlich. Im Epithel des Isthmus ist die Intensität der Expression des PR in allen Kulturstadien stärker als in der Ampulla, jedoch zeigen sich starke Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Die stärksten immunhistochemischen Reaktionen sind auch hier am Tag 0 zu verzeichnen. Einige basal gelegenen Kernen sind kräftig gefärbt. Die stark positiven Zellkerne befinden sich auch am Tag 2 basal. Dieses Bild entspricht in etwa dem am Tag 4 und Tag 7. Es ist jedoch eine deutlich absteigende Tendenz zu verzeichnen.

**Tab. 12 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) im Isthmus**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	+	+	+	+
SZ	++	++	++	++
BZ	-	-	-	-
L. propria	++	++	++	++
T. muscularis	+	+	-	-
Subserosa	-	-	-	-
Serosa	-/+	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria; T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 15** Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors im Isthmus des bovinen Eileiters.

A: Tag 0: In diesen Proben ist nur eine schwach positive Reaktion (Pfeil) der basal liegenden Zellen des Epithels (E) zu verzeichnen. L.p. = Lamina propria

B: Tag 2: Stark bis deutlich positive Zellkerne (Pfeil) befinden sich im gesamten Epithel (E). Die Lamina propria (L.p.) weist auch deutlich positive Reaktion auf.

C: Tag 4: In der Lamina propria (L.p.) befinden sich einige stark positive Zellkerne. Auch im Epithel (E) finden sich stark positive Kerne (Pfeil).

D: Tag 7: Die stark positiven Zellkerne (Pfeil) des Eileiterepithels (E) liegen basal. L.p. = Lamina propria

### 4.2.3 Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP)

Die Expression der OGP im Eileiter läßt sich hauptsächlich im Zytoplasma der sekretorischen Zellen des Epithels nachweisen. Die Fibrozyten in der Lamina propria und in den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis sind schwach positiv. Der histologische Nachweis erfolgt durch eine spezifische Braunfärbung des Zytoplasmas. Die Negativkontrollen sind vollständig ungefärbt.

#### *4.2.3.1 Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) in der Ampulla*

In der Ampulla ist das Zytoplasma der glatten Muskelzellen am Tag 0 deutlich (++) positiv für OGP. Die Fibrozyten der Lamina propria weisen auch eine deutlich positive Reaktion mit dem Antikörper auf. Die Gefäße zeigen keine Reaktion mit OGP an. In der Tela subserosa ist die Reaktion schwach (+) bis deutlich (++) positiv. In der Kultur fällt die Reaktion für OGP in den Muskelzellen, in der Lamina propria, sowie in der Tela subserosa negativ aus. Im Eileiterepithel färbt sich das gesamte Zytoplasma der sekretorischen Zellen intensiv an. Die Protrusionen der sekretorischen Zellen zeigen auch eine stark (+++) positive Reaktion. Die Zilienzellen erscheinen negativ. Diese Tendenz bleibt bis zum Ende der Kultur erhalten.

**Tab. 13 Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) in der Ampulla**

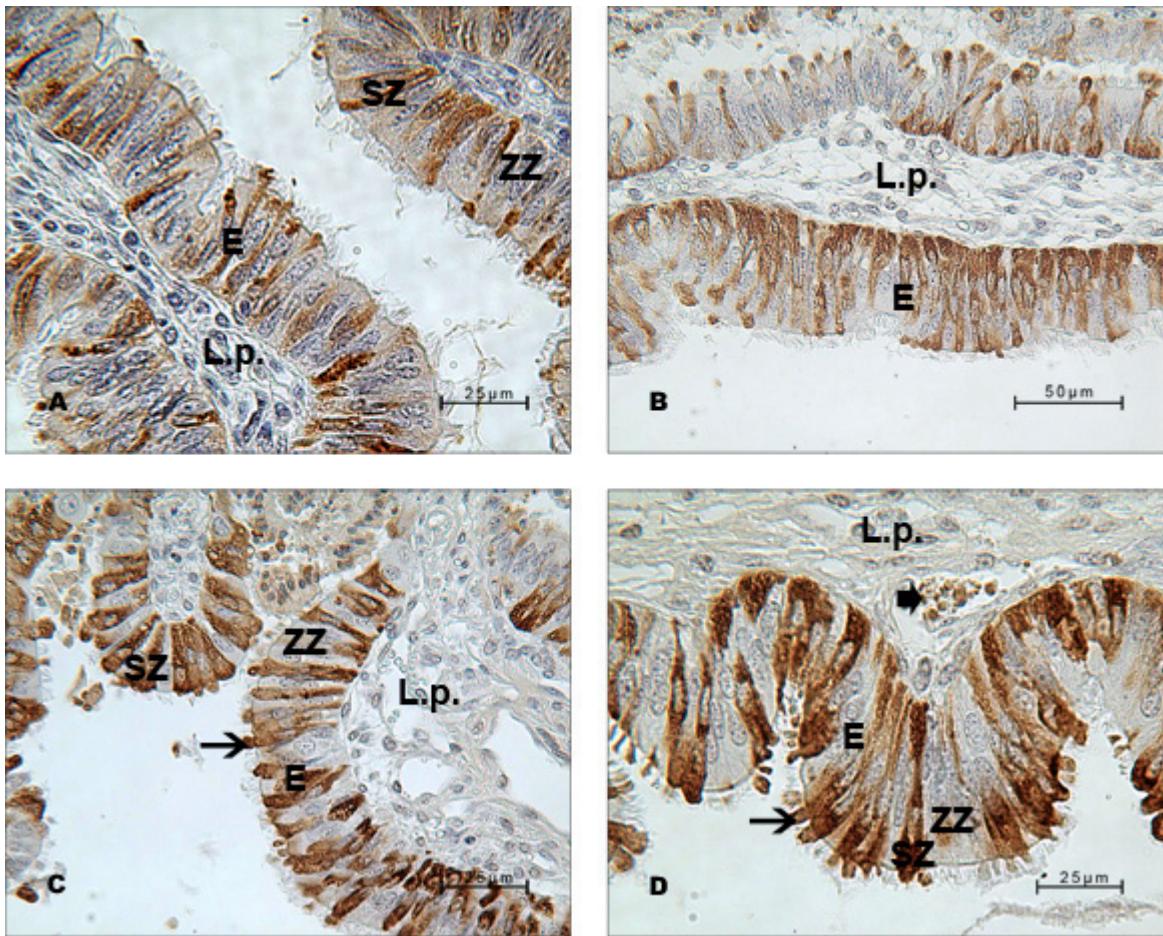
	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	-	-	-	-
SZ	+++	+++	+++	++/+++
BZ	-	-	-	-
L. propria	++	-	-	-
T. muscularis	++	-	-	-
Subserosa	++	-	-	-
Serosa	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria;

T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina





**Abb. 16** Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins in der Ampulla des bovinen Eileiters.

Es ist eine stark positive Reaktion im gesamten Zytoplasma der sekretorischen Zellen während der ganzen Kulturdauer zu beobachten (A: Tag 0, B: Tag 2, C: Tag 4, D: Tag 7).

L.p. = Lamina propria, Epithel = E, SZ = sekretorischen Zellen, ZZ = Zilienzellen,

Pfeil = Protrusion, groß Pfeil = Gefäß.

#### 4.2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) im Isthmus

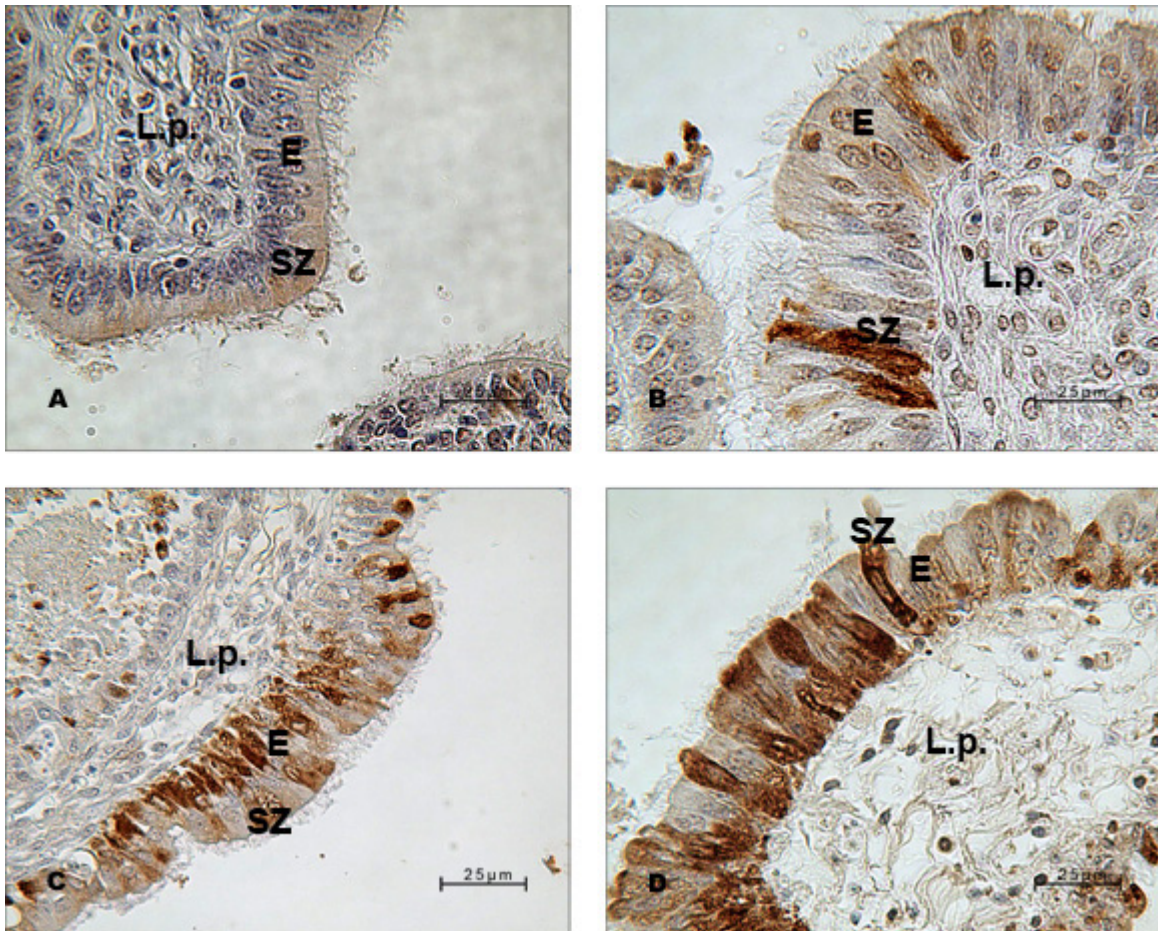
Im Isthmus fällt die Reaktion auf OGP deutlich schwächer als in der Ampulla aus. Eine schwach (+) bis deutlich (++) positive Reaktion ist nur im Zytoplasma der sekretorischen Zellen zu beobachten. Die einzelnen Proben zeigen starke Unterschiede. Vereinzelt sind während der gesamten Kulturperiode auch stark (+++) positive Zellen zu finden.

**Tab. 14 Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) im Isthmus**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	-	-	-	-
SZ	-/+	+	++	++
BZ	-	-	-	-
L. propria	-	-	-	-
T. muscularis	-	-	-	-
Subserosa	-	-	-	-
Serosa	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria; T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 17** Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins im Isthmus des bovinen Eileiters.

A: Tag 0: Eine schwach positive Reaktion ist hauptsächlich im supranukleären Zytoplasma der Zellen zu finden. L.p. = Lamina propria, Epithel = E, SZ = sekretorischen Zellen

B: Tag 2: Es sind vereinzelt stark positive Zellen zu beobachten. Lamina propria, Epithel = E, SZ = sekretorischen Zellen

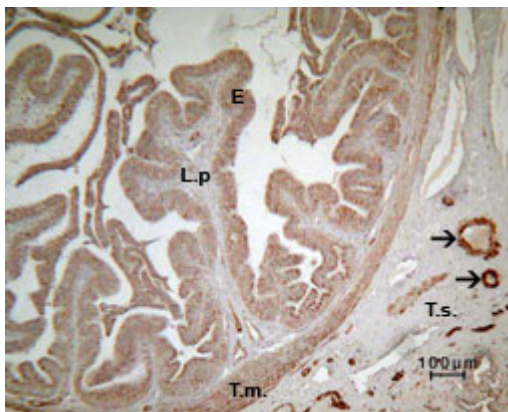
C: Tag 4: Hier zeigt sich eine stark positive Reaktion im basalen Zytoplasma einiger Zellen. Lamina propria, Epithel = E, SZ = sekretorischen Zellen

D: Tag 7: Einige Zellen im Epithel (E) zeigen eine starke Reaktion im gesamten Zytoplasma. Lamina propria, SZ = sekretorischen Zellen



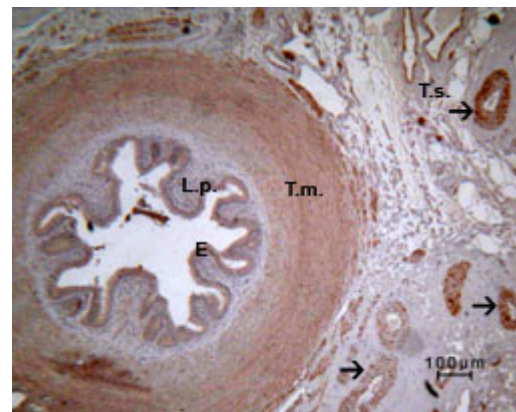
#### 4.2.4 Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP)

Der Antikörper gegen das „Uterine Milk Protein“ bindet spezifisch im supranukleären Zytoplasma der Epithelzellen, in der Tunica muscularis und in den Gefäßen der Tela subserosa. Die Reaktion in der Lamina propria fällt im allgemeinen während der gesamten Kulturperiode negativ aus. Die Gefäße der Lamina propria sind zum Teil stark positiv für UTMP. Die Basalzellen zeigen keine Reaktion mit den Antikörpern gegen UTMP. Die Reaktionsstärke des Epithels variiert stark in den beiden untersuchten Abschnitten und in den einzelnen Proben. In der Ampulla ist die immunhistochemische Reaktion wesentlich stärker als im Isthmus. In beiden Abschnitten reagieren die in der Mitte des Epithels lokalisierten Kerne stark UTMP-immunpositiv. Bei Zellen mit basal gelegenem Zellkerne fällt die Reaktion meistens negativ aus. Zwischen den einzelnen Proben, besonders aus dem Isthmus, bestehen sehr starke Unterschiede in der Expression von UTMP.



**Abb. 18** Immunhistologischer Nachweis von UTMP in der Ampulla am Tag 0.

Ampulla, Tag 0: die Tunica muscularis (T.m.) zeigt eine stark positive Reaktion an. In der Tela subserosa (T.s.) befinden sich große stark positive Gefäße (Pfeil). Epithel (E), Lamina propria (L.p.) fällt negativ aus.



**Abb. 19** Immunhistologischer Nachweis von UTMP im Isthmus am Tag 0.

Isthmus, Tag 0: die Tunica muscularis (T.m.) ist stark positiv für UTMP. Epithel (E), Lamina propria (L.p.) sind negativ. In der Tela subserosa (T.s.) befinden sich große stark positive Gefäße (Pfeil).



#### 4.2.4.1 Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP) in der Ampulla

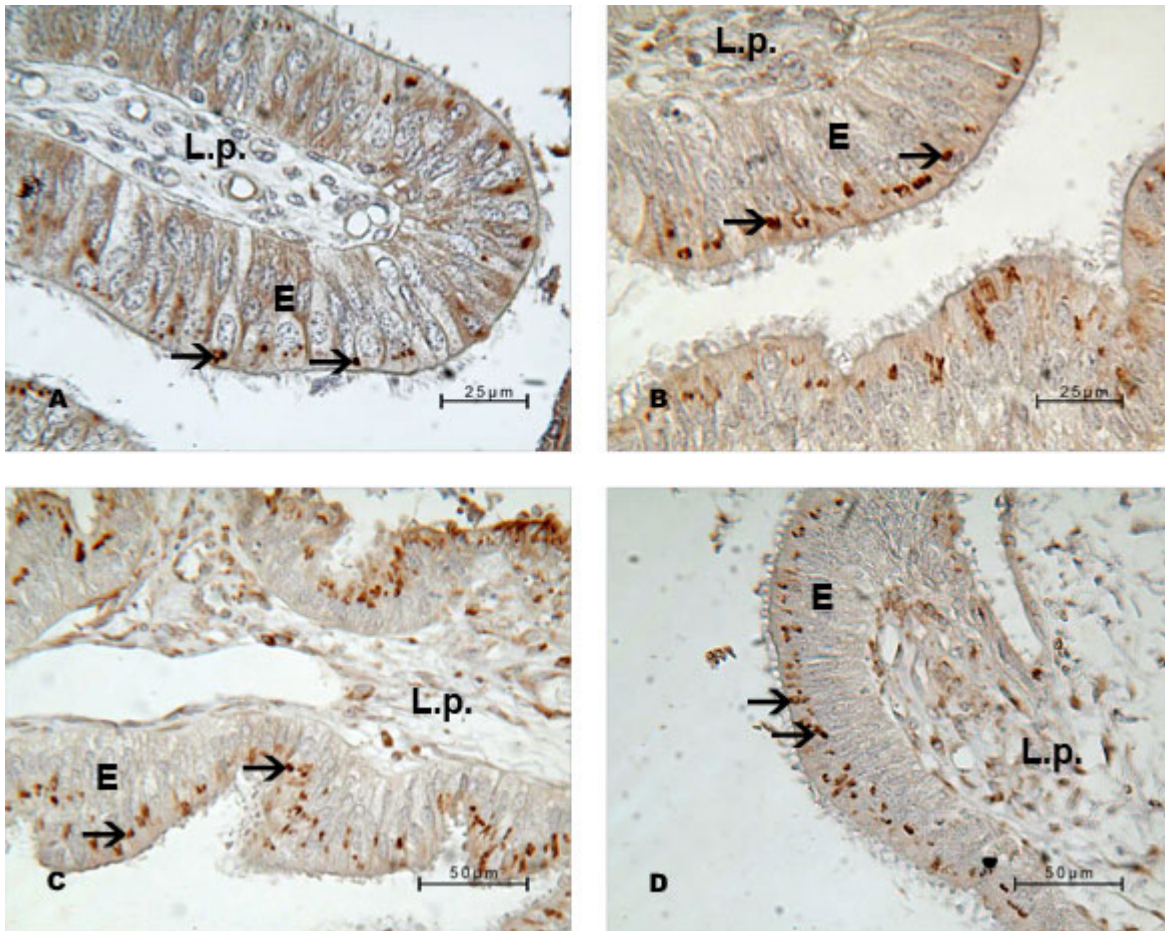
In der Ampulla sind die glatten Muskelzellen im Metöstrus stark positiv (+++) für UTMP. Die Fibrozyten der Lamina propria zeigen im Metöstrus keine Reaktion mit den UTMP-Antikörpern. Während der Kultur zeigen vereinzelte Fibrozyten eine deutlich (++) positive Reaktion. In den Basalzellen und in der Tela subserosa fällt die Immunreaktion auf UTMP während der gesamten Kultur negativ aus. In den Endothelien lässt sich UTMP deutlich nachweisen. Die Reaktionsintensität mit dem Antikörper gegen UTMP variiert insbesondere im Epithel innerhalb der untersuchten Eileiterabschnitte und Kulturzeiten. Es ist auffallend, dass in beiden Abschnitten, Ampulla und Isthmus, die Zellkerne der verschiedenen Zellen sich in ihrer Reaktionsintensität unterscheiden. Die Zellen mit basal lokalisierten Kernen weisen im allgemeinen keine UTMP-Reaktionen auf, im Gegensatz zu den Zellen mit in der Zellmitte gelegenen Kernen, die stark positiv sind.

**Tab. 15 Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP) in der Ampulla**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	+++	+++	+++	+++
SZ	-	-	-	-
BZ	-	-	-	-
L. propria	-	-	-	-
T. muscularis	+++	+++	+++	+++
Subserosa	-	-	-	-
Serosa	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	+++	+++	++/+++	++/+++

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria; T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 20** Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP) in der Ampulla des bovinen Eileiters.

Es ist eine stark positive Reaktion im supranukleären Zytoplasma (Pfeile) der Zellen während der ganzen Kulturdauer zu beobachten (A: Tag 0, B: Tag 2, C: Tag 4, D: Tag 7).

L.p. = Lamina propria, E = Epithel

#### 4.2.4.2 Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP) im Isthmus

Im Isthmus fällt die Reaktion mit UTMP deutlich schwächer als in der Ampulla aus. Die glatten Muskelzellen zeigen eine stark (+++) bis deutlich (++) positive Reaktion mit dem Antikörper. Das UTMP lässt sich in den Endothelien der Gefäße deutlich nachweisen. Die Lamina propria bleibt während der gesamten Kulturperiode negativ, ebenso die Tela subserosa. Im Epithel des bovinen Eileiters ist im supranukleären Zytoplasma der Zilienzellen eine stark (+++) positive bis negative (-) Reaktion zu beobachten. Die einzelnen Proben zeigen sehr starke Unterschiede. Vereinzelt sind während der gesamten Kulturperiode auch stark (+++) positive Zellen zu finden.

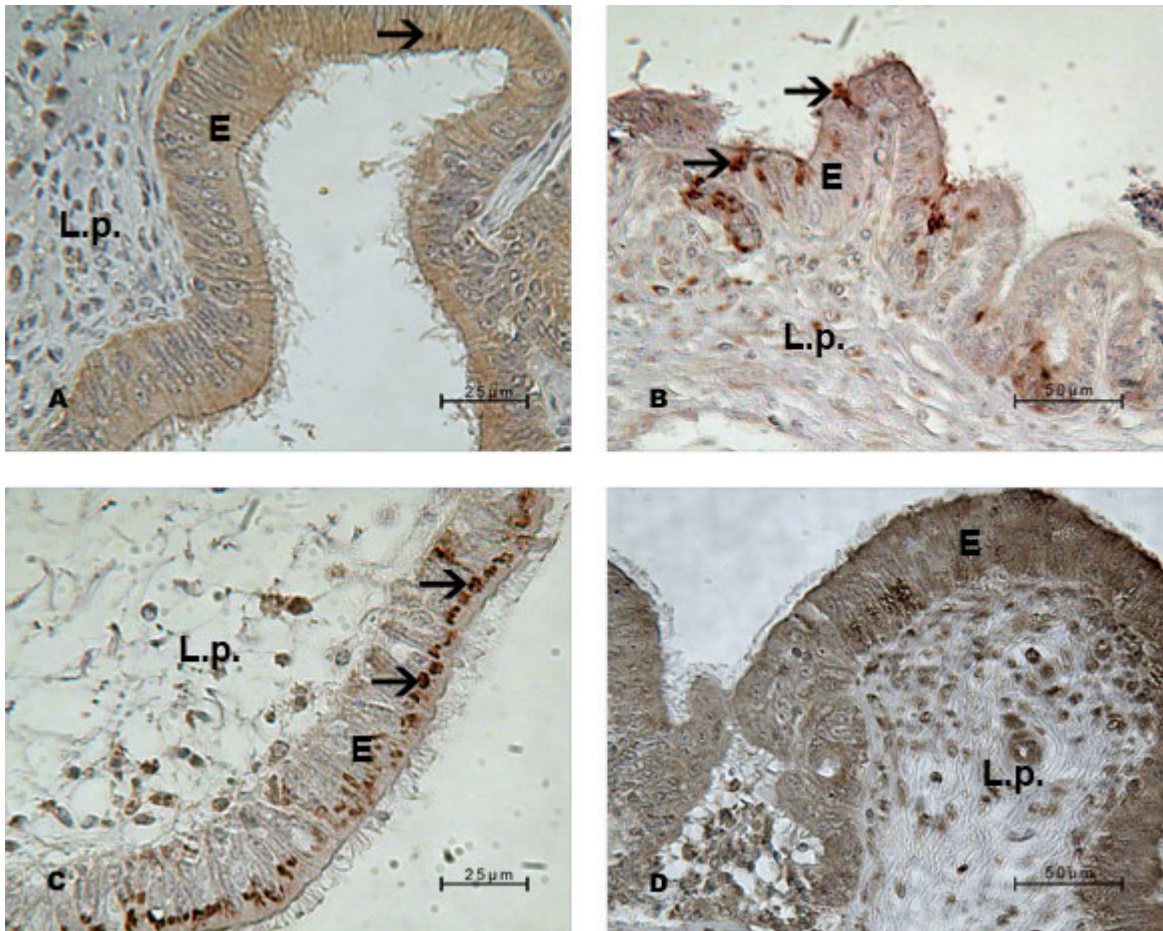
**Tab. 16 Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP) im Isthmus**

	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 7
ZZ	-/+++	-/++	-/++	-/++
SZ	-	-	-	-
BZ	-	-	-	-
L. propria	-	-	-	-
T. muscularis	+++	+++	+++	+++
Subserosa	-	-	-	-
Serosa	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
Gefäße	+++	+++	++/+++	++/+++

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

ZZ = Zilienzellen; SZ = sekretorische Zellen; BZ = Basalzellen; L. propria = Lamina propria;

T. muscularis = Tunica muscularis; BL = Basallamina



**Abb. 21** Immunhistochemischer Nachweis des „Uterine Milk Protein“ (UTMP) im Isthmus des bovinen Eileiters.

A: Tag 0: Vereinzelt ist eine positive Reaktion im supranukleären Zytoplasma der Zellen (Pfeil) zu finden. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

B: Tag 2: Es sind vereinzelt stark positive Zellen (Pfeil) zu beobachten. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

C: Tag 4: Hier zeigt sich eine stark positive Reaktion im supranukleären Zytoplasma (Pfeil) der meisten Zellen. L.p.= Lamina propria, Epithel = E

D: Tag 7: Es ist keine Reaktion im Epithel (E) zu verzeichnen.  
L.p. = Lamina propria

### 4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Das bovine Eileiterepithel ist einschichtig hochprismatisch. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen sind gleicher Höhe. Ein Teil der sekretorischen Zellen wölbt sich ins Zelllumen vor und zeigt apikale Protrusionen. Beide Zellarten sitzen auf einer nur leicht gewellten Basalmembran auf. Die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen kommen in der Regel alternierend vor. Sie können einzeln oder in Gruppen liegen. Es werden gelegentlich auch runde, basal gelegene Zellen gefunden, die nicht an der Basalmembran verankert sind und bei denen es sich um Lymphozyten handelt.

Die Zellmembranen zwischen den benachbarten Zilienzellen verlaufen relativ gleichmäßig. Im Vergleich dazu haben die sekretorischen Zellen eher eine gewellte Membran.

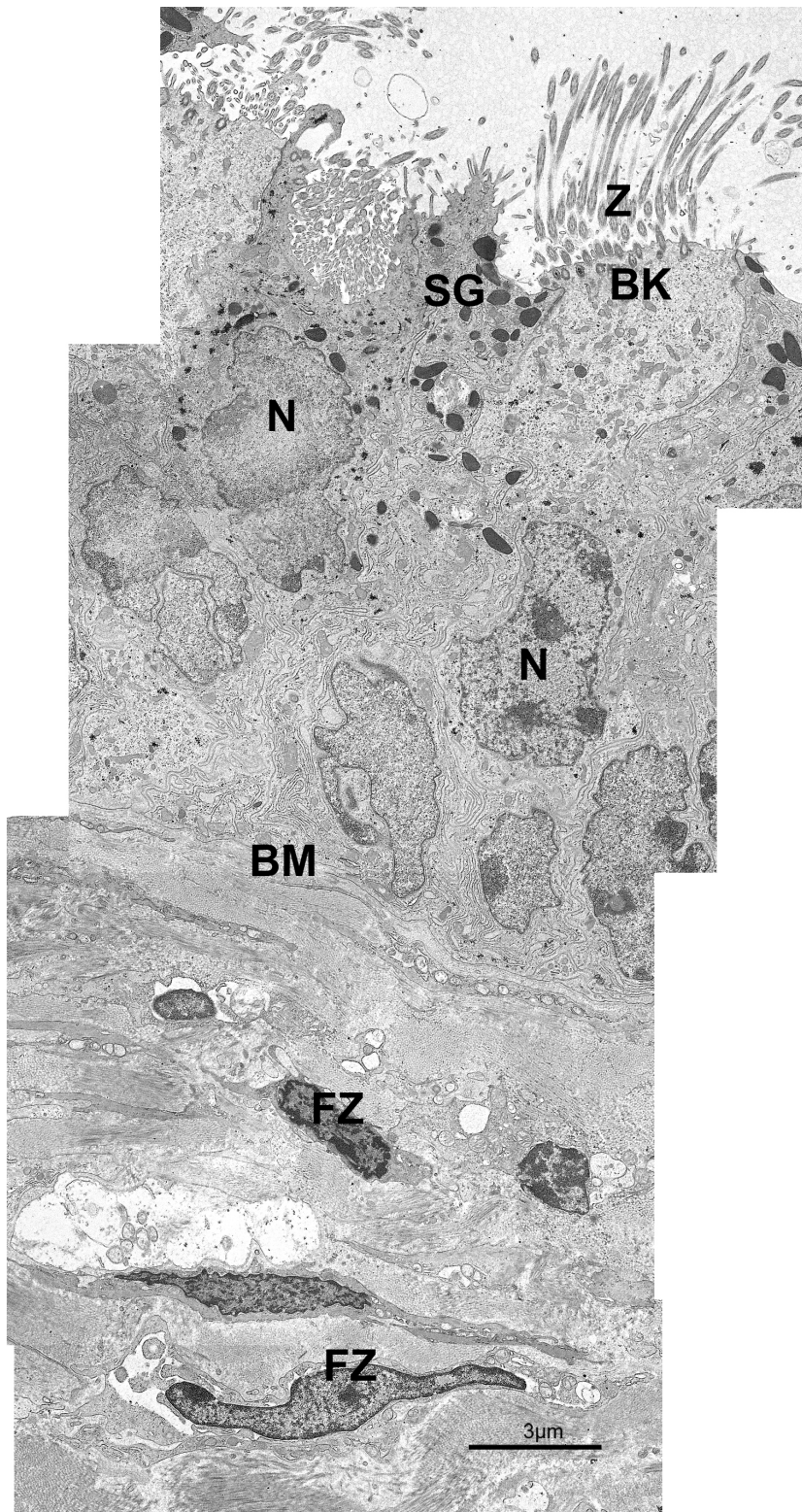
Benachbarte Zellen sind durch gut ausgebildete Zellverbindungen miteinander verbunden. Die Zonulae occludentes oder „tight junctions“ befinden sich unmittelbar unter der freien Oberfläche des Epithels. Hier verschmelzen die Membranen benachbarter Zellen. Der lumen-nahe Fusionsbereich erstreckt sich über die ganze Zirkumferenz der Zelle. Diese „tight junctions“ versiegeln den Interzellularraum nahe der Epitheloberfläche gegen das Lumen. In den anschließenden Zonulae adhaerentes verlaufen die Membranen der benachbarten Zellen parallel zueinander. Weiter lassen sich gut ausgebildete Desmosomen beobachten. Die Zellmembranen zeigen in diesem Bereich auf der jeweiligen Zytoplasmaseite Haftplatten aus elektronendichtem Material, in die zytoplasmatische Intermediärfilamente (Tonofilamente) einstrahlen.

Die Zilienzellen besitzen zwei Arten von Oberflächenstrukturen, bewegliche Kinozilien und Mikrovilli, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Die Zilien konzentrieren sich eher in der Mitte der Zellen und werden zur Peripherie der Zellen weniger. Sie besitzen die typische  $(9 \times 2) + 2$ -Struktur. Ihre Basalkörperchen liegen in regelmäßiger Anordnung direkt unter der apikalen Zellmembran. Es sind auch Deuterosomen und Prozentriolen zu beobachten, was für eine Ziliogenese spricht. Die Zellkerne der Zilienzellen befinden sich im apikalen Drittel der Zelle. Sie haben eine ovale Form, ziemlich große Nucleoli und eine relativ glatte Kernmembran. Sie enthalten hauptsächlich Euchromatin, nur in den Randbezirken ist auch kondensiertes Chromatin (Heterochromatin) zu finden. Die Zilienzellen haben zahlreiche Mitochondrien. Diese liegen mehr oder weniger parallel zur Längsachse der Zelle im supranukleären Areal. Der Golgi-Apparat besteht aus mehreren Stapeln von Zisternen und Vesikeln unterschiedli-

cher Größe. Das gut ausgebildete endoplasmatische Retikulum der Zilienzellen weist nah aneinander liegende Zisternen auf. Die sekretorischen Zellen haben im Vergleich zu den ziliotragenden Zellen ein deutlich elektronendichteres Zytoplasma. Ihr Zytoplasma weist viele Polyribosomen auf. Die sekretorischen Zellen besitzen als Oberflächenstruktur Mikrovilli. Apikal weisen die sekretorischen Zellen, abhängig vom Zyklusstadium, Protrusionen auf. Die Protrusionen können sowohl sekretorische Granula, endoplasmatisches Retikulum, gelegentlich Mitochondrien und auch Zellkerne enthalten. Die Zellkerne der sekretorischen Zellen befinden sich im basalen Drittel der Zelle. Sie werden, wie erwähnt, zyklusabhängig bei manchen Zellen in die Protrusionen verlagert. Diese Kerne zeigen oft eine unregelmäßige Form, mit starken Einkerbungen in der Kernhülle. Die sekretorischen Zellen zeigen ein stark ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (RER), das dicht gepackt und ribosomenreich ist und sich apikal oder supranukleär in der Zelle befindet. Es besteht aus kurzen Zisternen oder Vesikeln und erscheint oft deutlich dilatiert. In den sekretorischen Zellen kommen relativ wenig Mitochondrien vor. Sie befinden sich meist im apikalen Zytoplasma der Zelle und sind relativ groß. Die sekretorischen Zellen enthalten einen gut ausgebildeten Golgi-Komplex. Er liegt im supranukleären Zytoplasma. Selten ist er apikal gelegen. Verschieden strukturierte sekretorische Granula kommen ausschließlich bei den sekretorischen Zellen vor. Ihre Form ist rund oder oval bis länglich-oval. Sie sind meist direkt unter der apikalen Zellmembran lokalisiert. Der Großteil der Granula ist stark elektronendicht und erscheint dadurch homogen dunkel. Zusätzlich werden auch weniger elektrondichte Granula beobachtet. Die stark elektronendichten Granula sind direkt unter der apikalen Zellmembran lokalisiert. Basal von ihnen sind dann meist die weniger dichten Granula angeordnet. Es sind auch lamellar strukturierte sekretorische Granula zu beobachten.

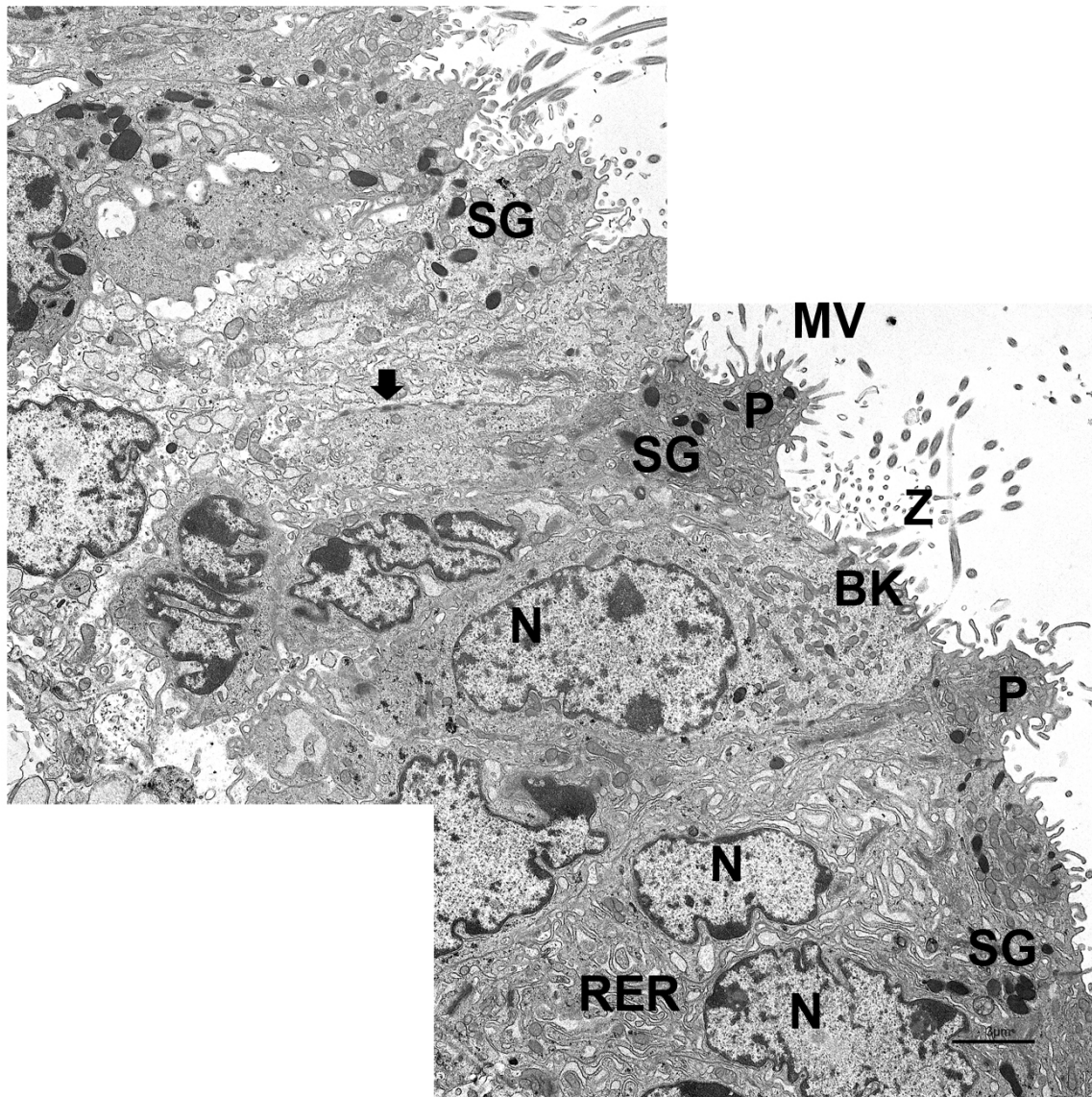
Die dritte Zellart im Eileiterepithel sind die basal lokalisierten Lymphozyten. Es handelt sich um kleine, runde Zellen mit heterochromatischem Kern und wenig hellem Zytoplasma. Sie liegen in der Nähe der Basallamina, sind aber nicht an ihr verankert. Sie weisen auch keine Verbindungen zu den Nachbarzellen auf.





**Abb. 22** Überblick über das Eileiterepithel mit darunter liegendem Bindegewebe der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

Das einschichtig hochprismatische Epithel sitzt der Basalmembran (BM) auf, dessen Fibrozyten longitudinal zum Epithel liegen. FZ = Fibrozyt, BK = Basalkörperchen, N = Nukleus, SG = sekretorische Granula, Z = Zilien.

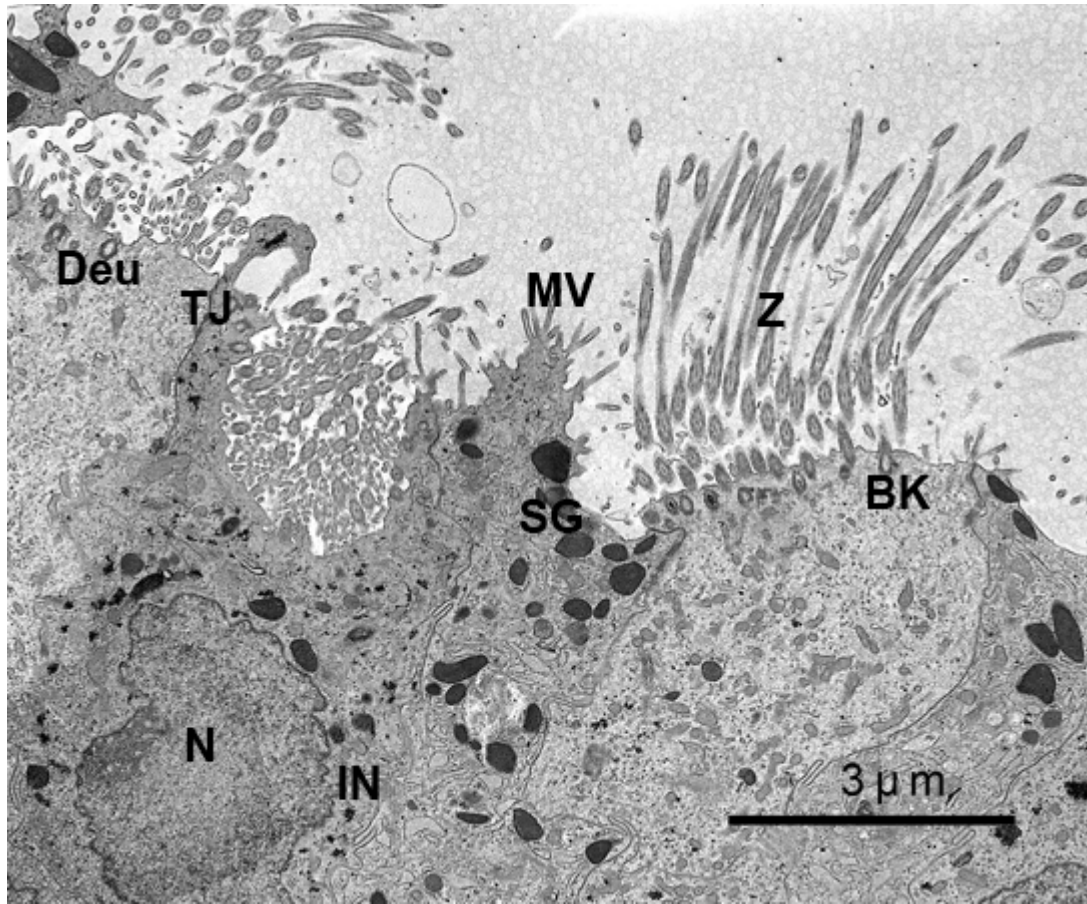


**Abb. 23** Ausschnitt aus dem Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

Das einschichtig hochprismatische Epithel setzt sich aus zilientragenden und sekretorischen Zellen zusammen. Diese liegen dicht aneinander und kommen meist abwechselnd vor.

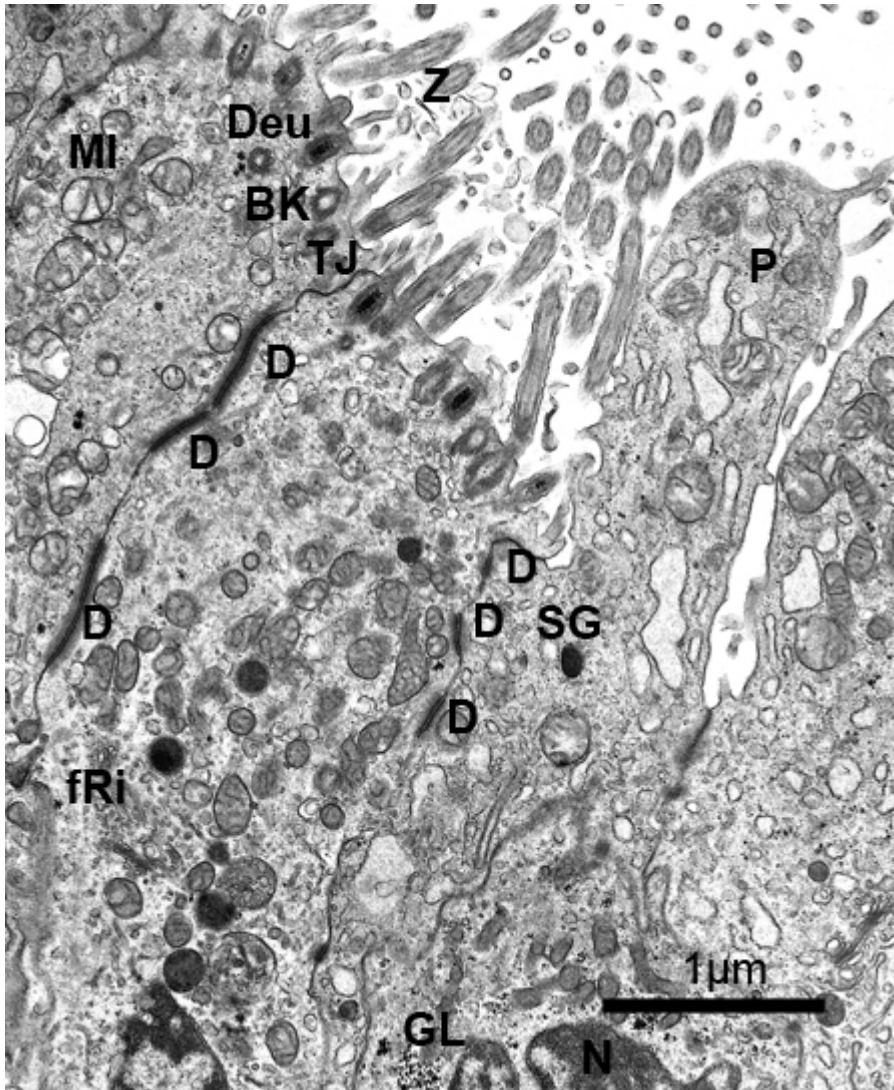
BK = Basalkörperchen, MV = Mikrovilli, N = Nukleus, P = Protrusionen, RER = raues endoplasmatisches Retikulum, SG = sekretorische Granula, Z = Zilien, Pfeil = Desmosomen





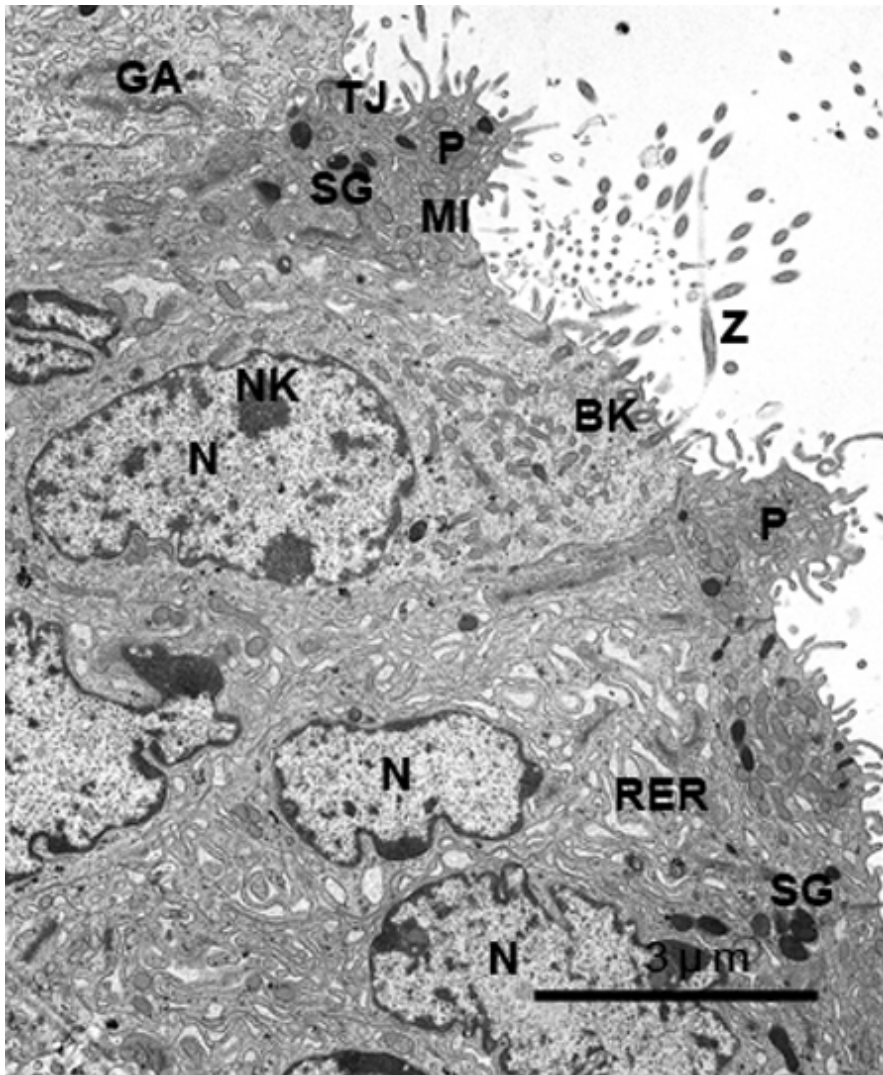
**Abb. 24** Ziliogenese in der Ampulla (Metöstrus) des Eileiters am Tag 0.

Im apikalen Bereich der Zilienzellen sind deutliche Anzeichen für Ziliogenese zu erkennen: fibröse Granula und Deutorosomen (Deu). Zudem sind zahlreiche Basalkörper (BK) zu erkennen. Die Zellen sind eng über Desmosomen und „tight junctions“ (TJ) verbunden. Im apikalen Zytoplasma liegen zahlreiche Mitochondrien vom Cristae-Typ. IN = Invaginationen, MV = Mikrovilli, N = Nukleus, SG = sekretorische Granula, Z = Zilien.



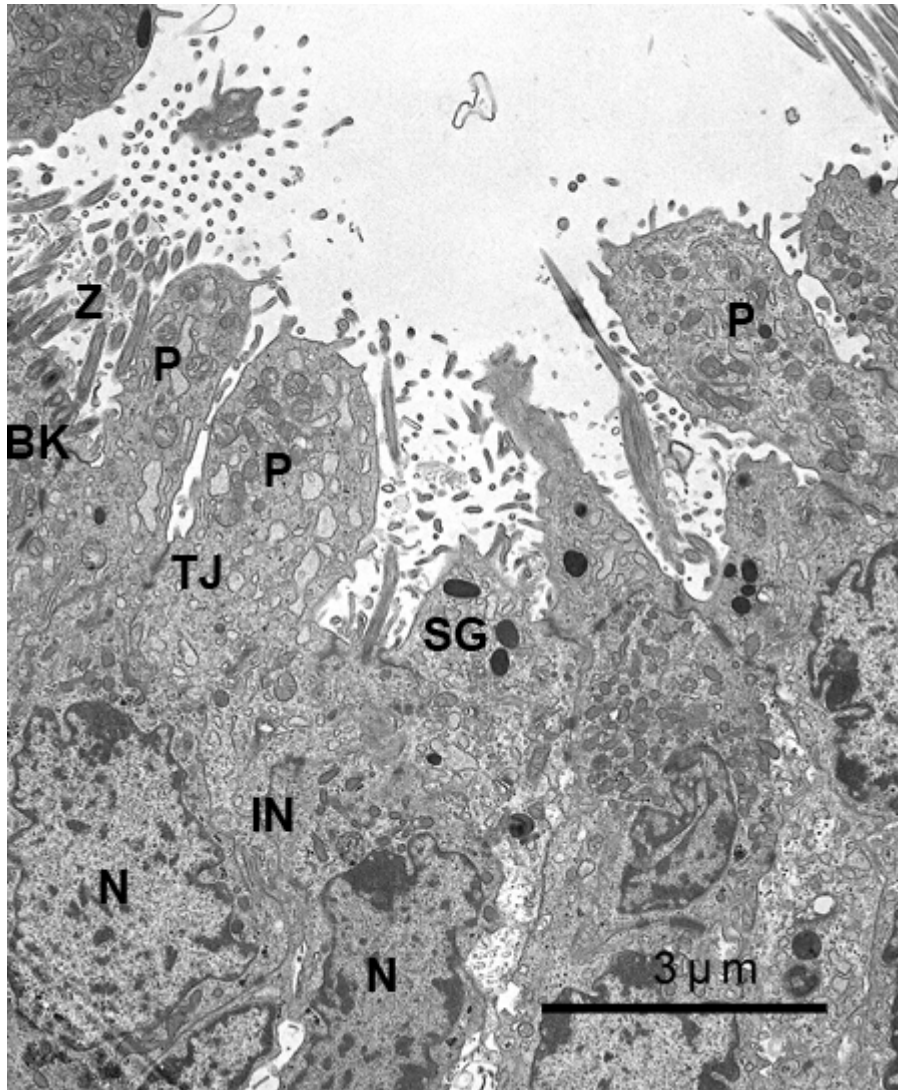
**Abb. 25** Ausschnitt aus dem Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

Die zilientragenden Zellen sind deutlich von den sekretorischen Zellen zu unterscheiden. An der luminalen Seite der Zilienzellen sind Zilienanschnitte der Struktur  $(9 \times 2) + 2$  zu erkennen. Die Zilienzellen sind durch ein helleres, weniger elektronendichtes Zytoplasma und becherförmige Gestalt gekennzeichnet. Im Gegensatz hierzu stellen sich die sekretorischen Zellen schmäler und mit deutlich elektronendichtem Zytoplasma und großen sekretorischen Vakuolen (SG) dar. BK = Basalkörperchen, D = Desmosomen, Deu = Deuterosomen, fRi = freie Ribosomen, GL = Glykogenansammlung, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, P = Protrusion, SG = sekretorische Granula, TJ = „tight junction“, Z = Zilien



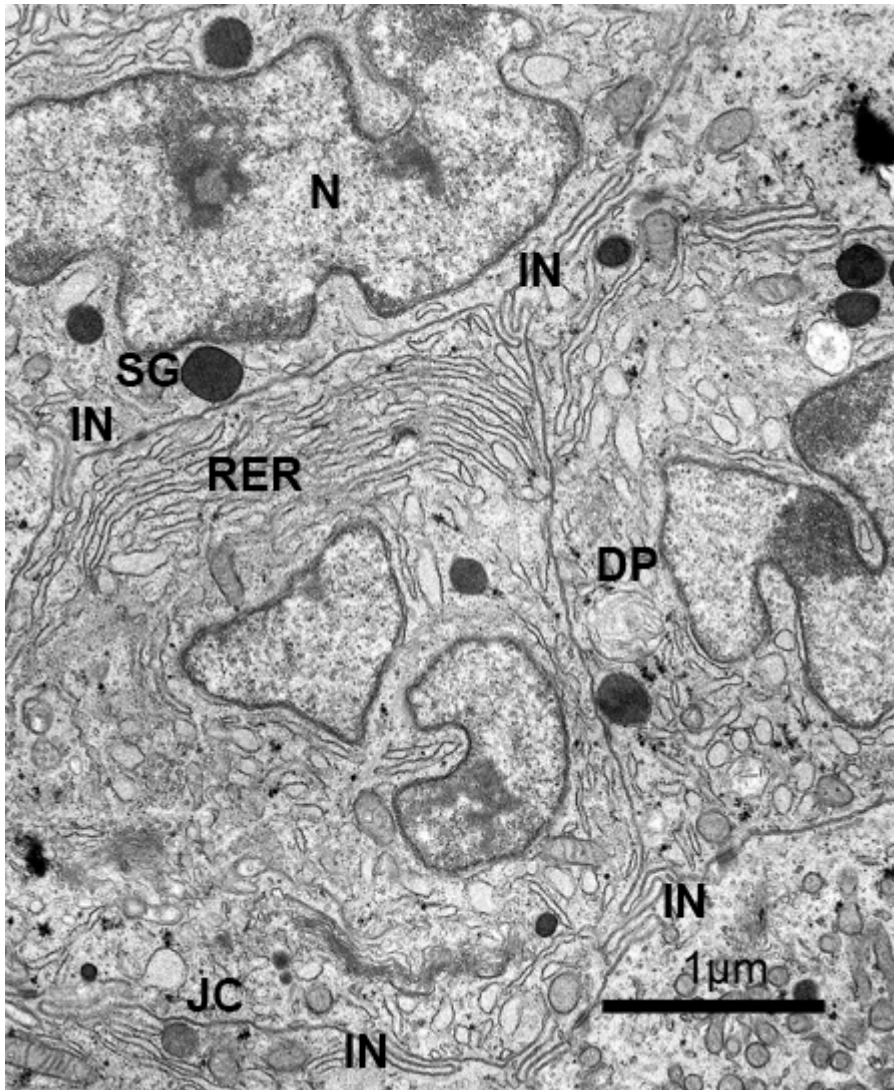
**Abb. 26** Sekretorische Zellen in der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

Sekretorische und Zilienzellen sind in diesem Epithelausschnitt gut zu differenzieren. Einige der sekretorischen Zellen bilden Protrusionen (P) aus, an deren Oberfläche zahlreiche Mikrovilli zu erkennen sind. Im Gegensatz hierzu sind die Zilienzellen durch eine plane Oberfläche mit zahlreichen Zilien (Z) gekennzeichnet. BK = Basalkörperchen, GA = Golgi Apparat, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, NK = Nukleolus, P = Protrusionen, RER = raues endoplasmatisches Retikulum, SG = sekretorische Granula, TJ = „tight junction“.



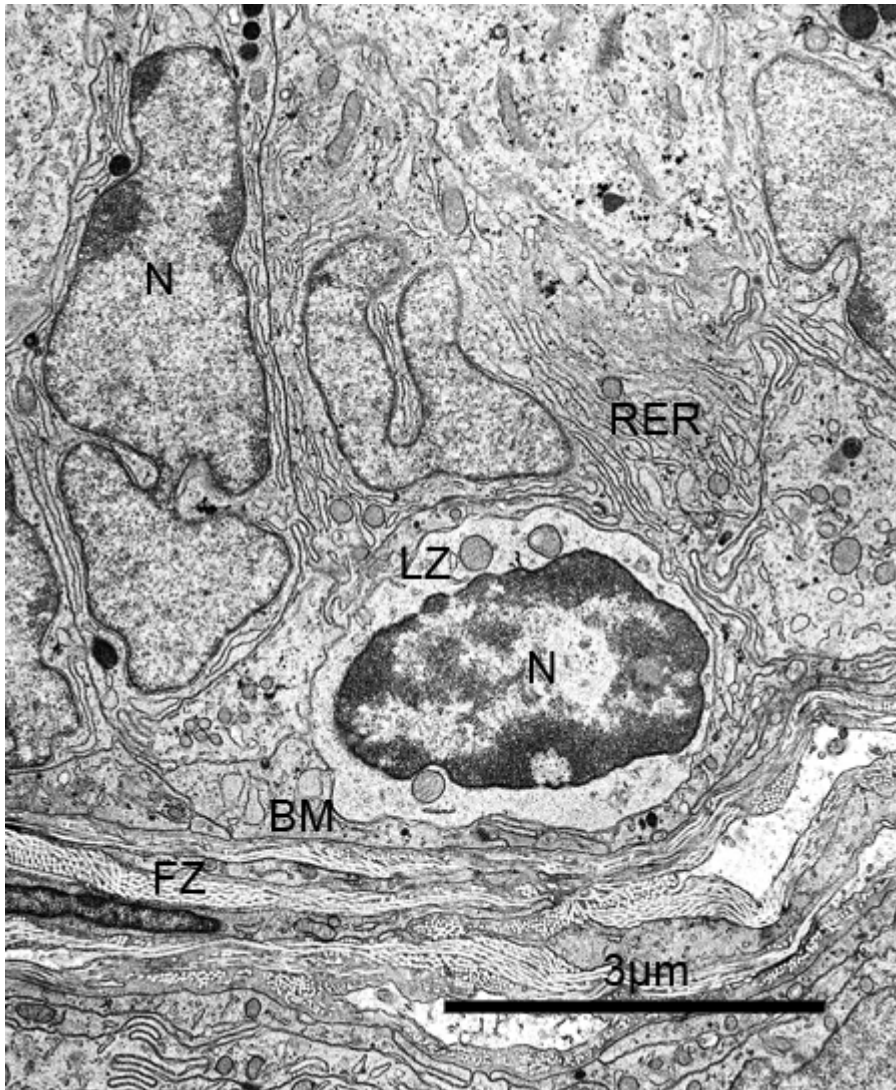
**Abb. 27** Protrusionen der sekretorischen Zellen in der Ampulla des bovinen Eileiters am Tag 0.

Die Protrusionen (P) der sekretorischen Zellen sind unregelmäßig geformt. Innerhalb der Protrusionen sind sekretorische Granula (SG), endoplasmatisches Retikulum sowie Mitochondrien zu finden. BK = Basalkörperchen, IN= Invagination, N = Nukleus, P = Protrusion, TJ = „tight junctions“, Z = Zilien.



**Abb. 28** Epithelausschnitt aus der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

Innerhalb des Epithels sind zahlreiche Zellverbindungen zu erkennen: „junctional complexes“ (JC) und Invaginationen (IN). Desweiteren sind in den sekretorischen Zellen ein stark ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum (RER) sowie „digiprints“ (DP) zu lokalisieren.  
 N = Nukleus, SG = sekretorische Granula.



**Abb. 29** Lymphozyt im Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.

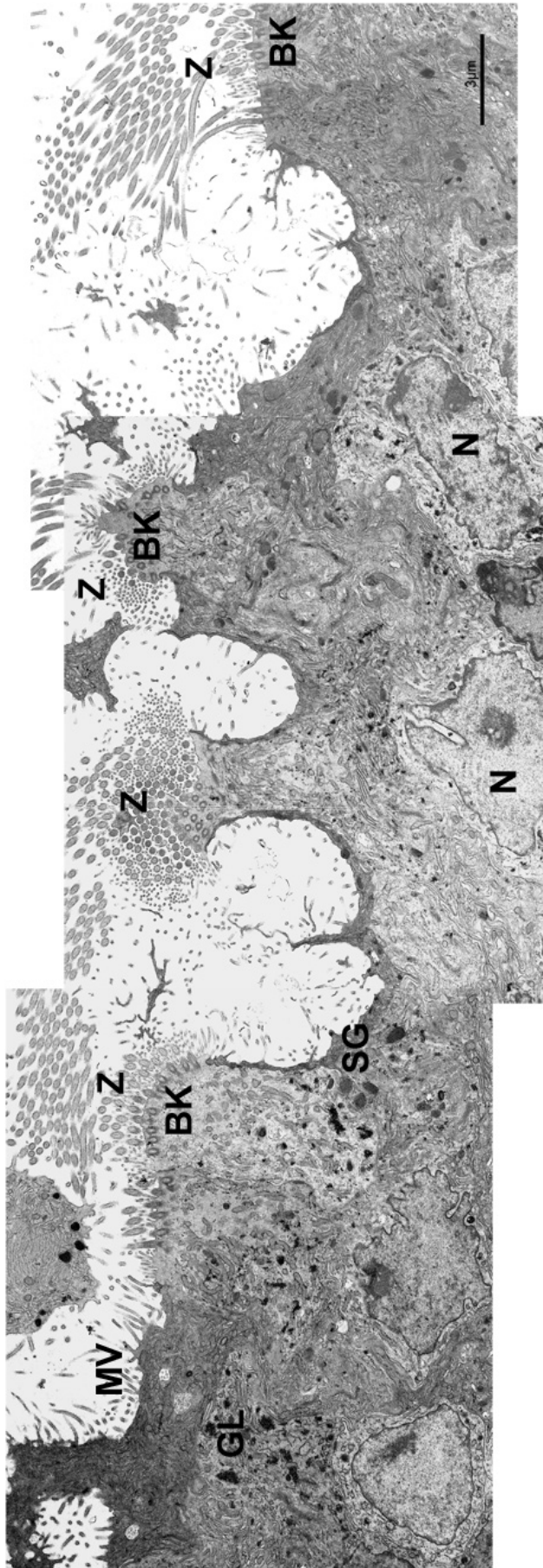
Der basal liegende Lymphozyt (LZ) ist klein. Er besitzt einen großen Kern (N) und ist von hellem Zytoplasma umgeben. BM = Basalmembran, FZ = Fibrozyt, RER = raues endoplasmatisches Retikulum.



Am Tag 2 der Zellkultur können die Zilienzellen und die sekretorischen Zellen sehr gut voneinander unterschieden werden. Die Zilienzellen besitzen gut ausgebildete Zilien, zahlreiche Basalkörper, Deuterosomen und Prozentriolen, welche deutliche Anzeichen für eine Ziliogenese sind. Supranukleär befinden sich zahlreiche Mitochondrien. Die Zellkerne der Zilienzellen haben eine relativ glatte Kontur und meistens einen Nukleus. RER und GA sind auch ebenso gut erhalten.

Die sekretorischen Zellen haben zahlreiche intakte Mikrovilli. Sie besitzen relativ viel, meistens dilatiertes RER. Auch ihre Zellkerne sehen intakt aus. Sie besitzen häufig mehr als einen Nukleolus. Die sekretorischen Granula kommt im Vergleich zu Tag 0 in verminderter Anzahl vor. Es sind verschiedene Arten von Protrusionen zu beobachten. Manche enthalten nur Granula und Vakuolen, andere auch Zellorganellen und Zellkerne.

Ein sehr interessanter Befund sind Zellen, die sowohl Merkmale von sekretorischen Zellen (Mikrovilli und sekretorische Granula, viel RER), als auch von Zilienzellen aufweisen (deutlich zu sehen sind auch Deuterosomen). Bei allen Epithelzellen sind verschiedene Lysosomen und Vakuolen zu beobachten. Die Glykogenansammlungen kommen im Vergleich zum Tag 0 vermehrt vor, die Basalmembran ist eben und nicht unterbrochen.

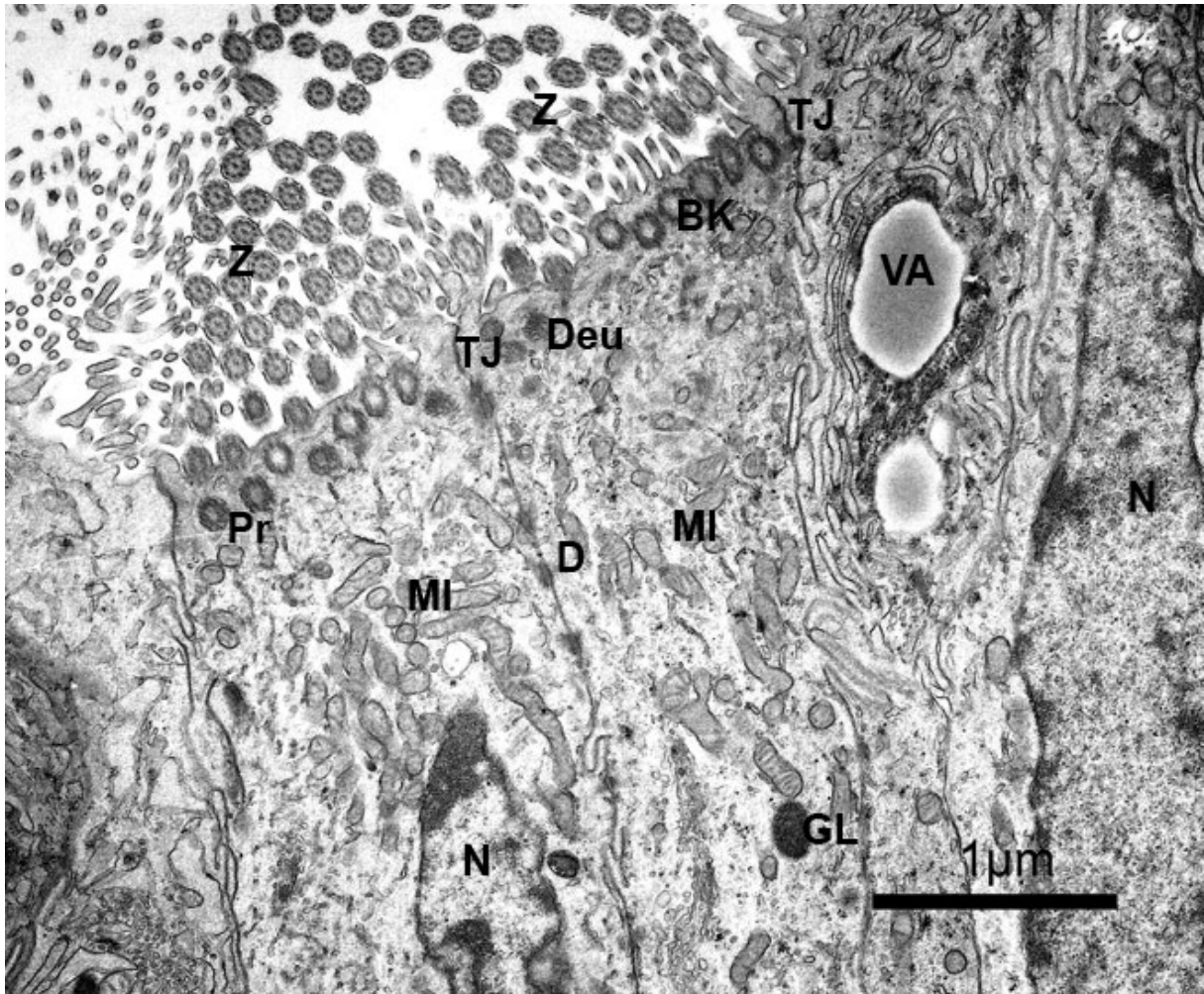


**Abb. 30** Eileiterreithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur.

Zilienzellen und sekretorische Zellen sind im Eileiterreithel zu lokalisieren. Auffallend sind zilientragende Zellen, welche sich protrusionsartig ins Lumen vorwölben und apikal zahlreiche Kinozilien aufweisen.

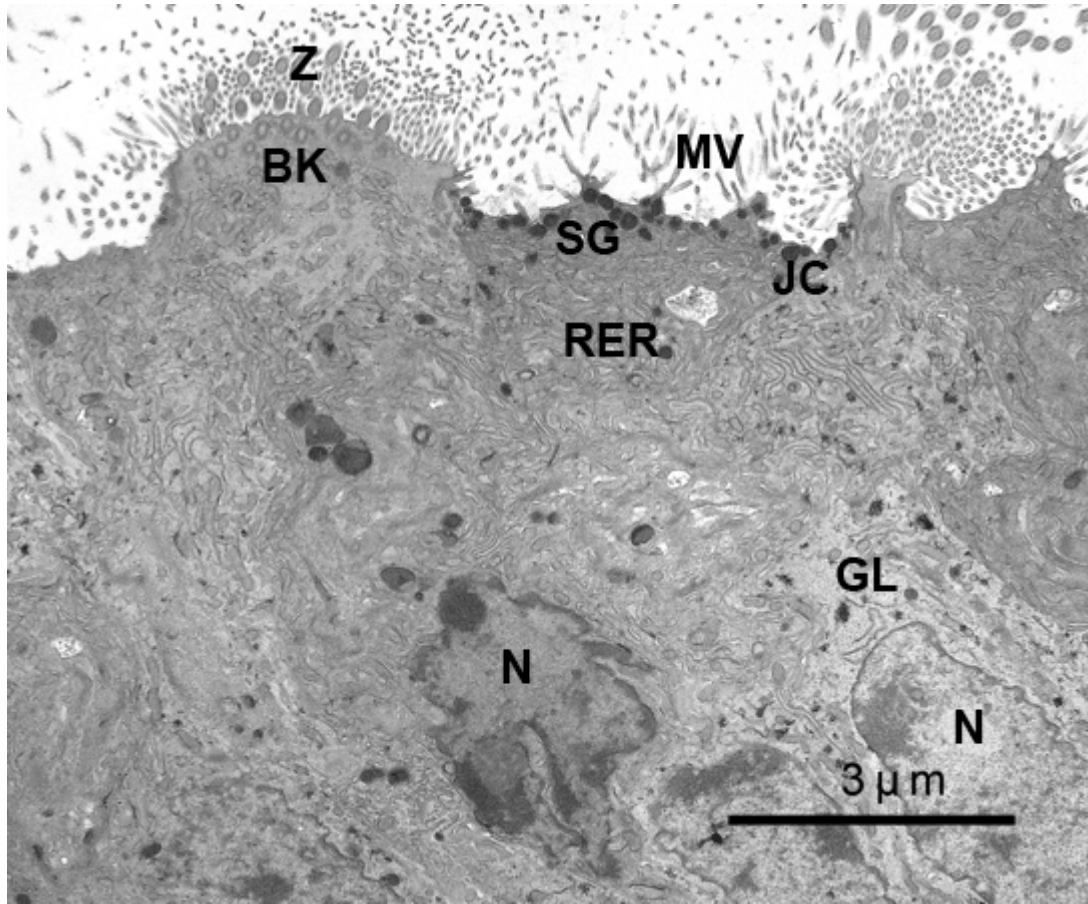
BK = Basalkörperchen, GL = Glykogenansammlung, SG = sekretorische Granula, MV = Mikrovilli, N = Nukleus, Z = Zilien.





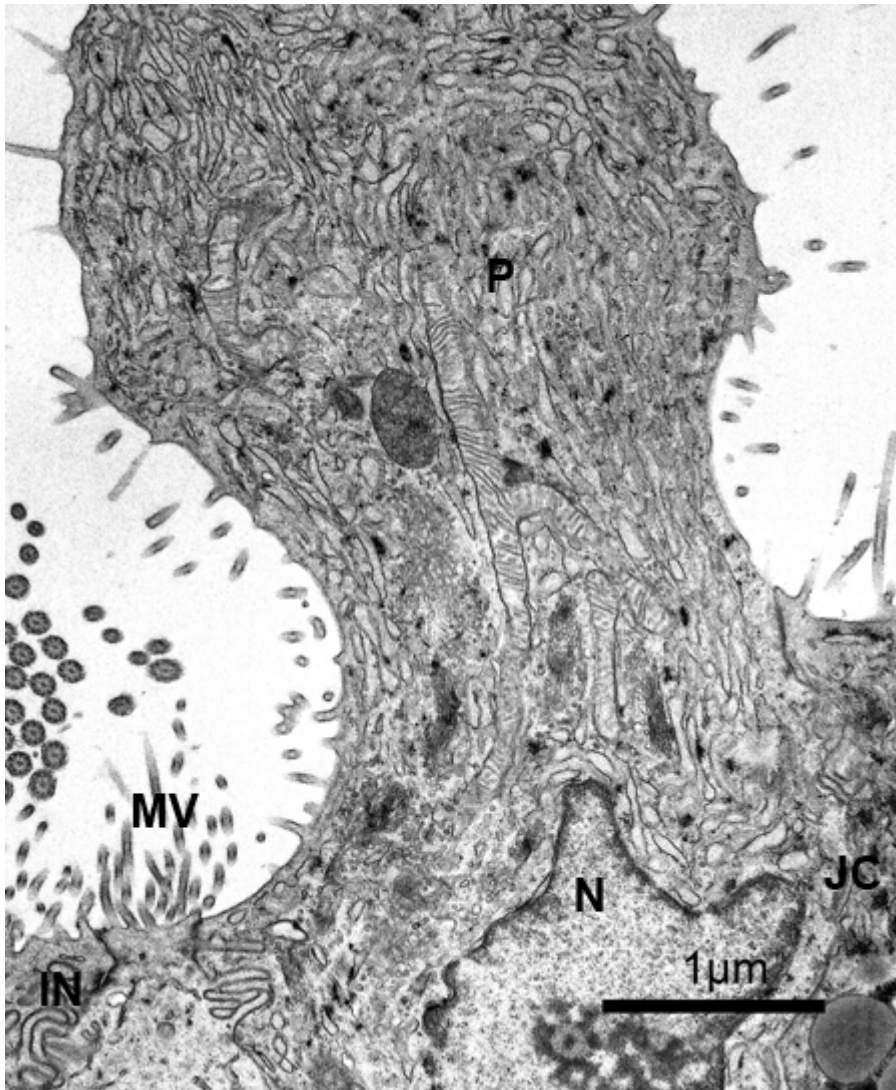
**Abb. 31** Ziliogenese im Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur.

Innerhalb der zilientragenden Zellen sind deutliche Anzeichen für aktive Ziliogenese zu erkennen: Deuterosomen (Deu), Prozentriolen (Pr) und Basalkörper (BK). D = Desmosomen, GL = Glykogenansammlung, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, TJ = „tight junctions“, VA = lipidhaltige Vakuole, Z = Zilien.



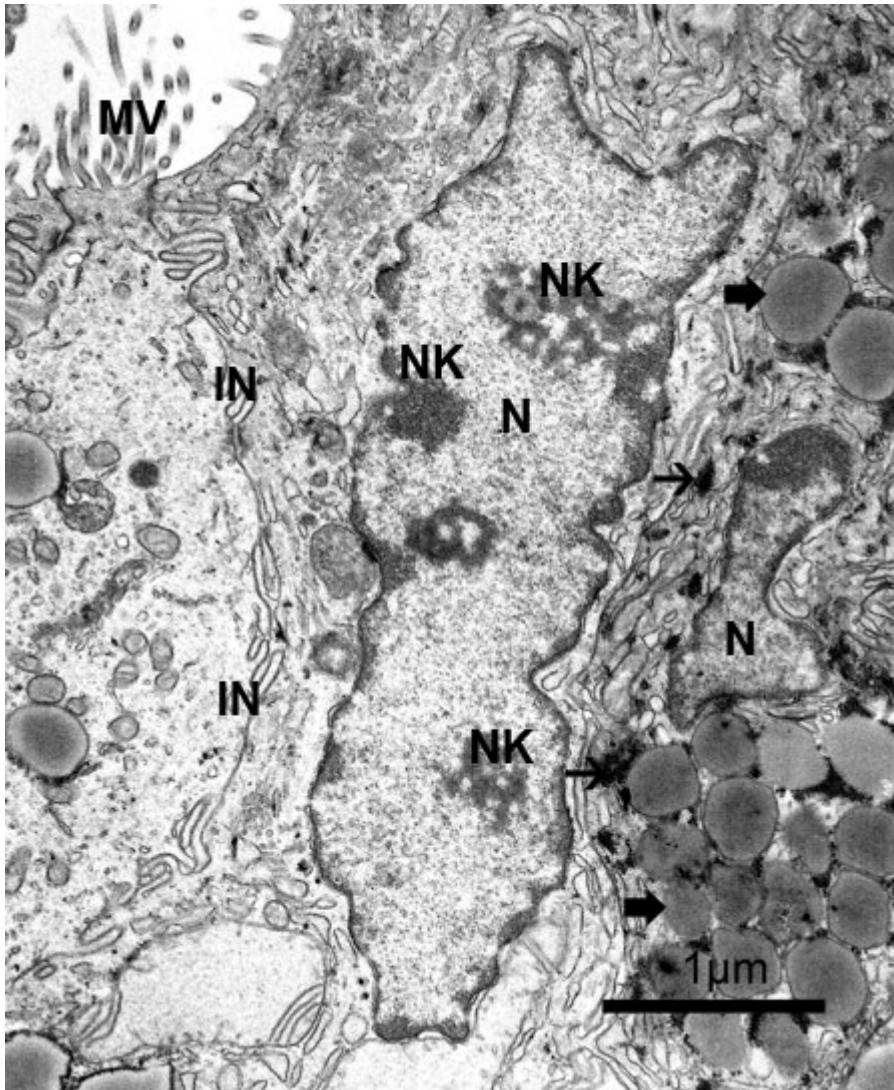
**Abb. 32** Ausschnitt aus dem Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur.

Unter der apikalen Zellmembran der sekretorischen Zelle befinden sich zahlreiche elektronendichte sekretorische Granula (SG), die zum Teil mittels Exozytose ins Lumen ausgeschleust werden. BK = Basalkörperchen, GL = Glykogenansammlung, JC = „junctional complexes“, MV = Mikrovilli, N = Nukleus, Z = Zilien, RER = raues endoplasmatisches Retikulum.



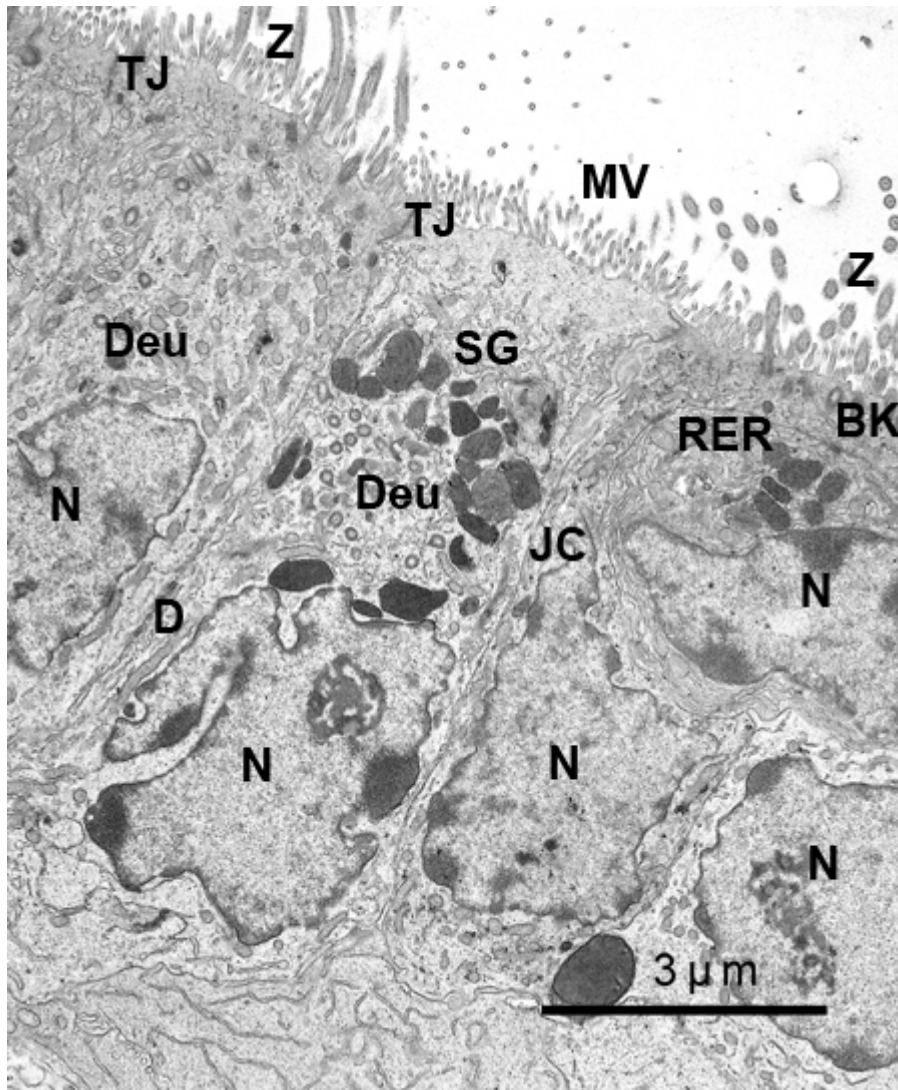
**Abb. 33** Protrusionen der sekretorischen Zellen im Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur.

Die Protrusionen (P) wölben sich ballonartig ins Lumen vor und enthalten zahlreiche Zellorganellen und Vakuolen. Die Oberfläche der Protrusion weist zahlreiche Mikrovilli (MV) auf. IN = Invagination, JC = „junctional complexes“, N = Nukleus.



**Abb. 34** Sekretorische Zelle im Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur.

Die schmalen sekretorischen Zellen besitzen einen länglichen Zellkern (N), welcher viel Euchromatin und randständiges Heterochromatin aufweist. Sie besitzen mehrere Nukleoli (NK). Die Zellen liegen dicht beieinander und stehen durch „tight junctions“ und zahlreiche Invaginationen (IN) in engem Kontakt. Weiterhin fallen auf: große Lipidvakuolen und Glykogenansammlungen sowie stark dilatiertes raues endoplasmatisches Retikulum. MV = Mikrovilli.



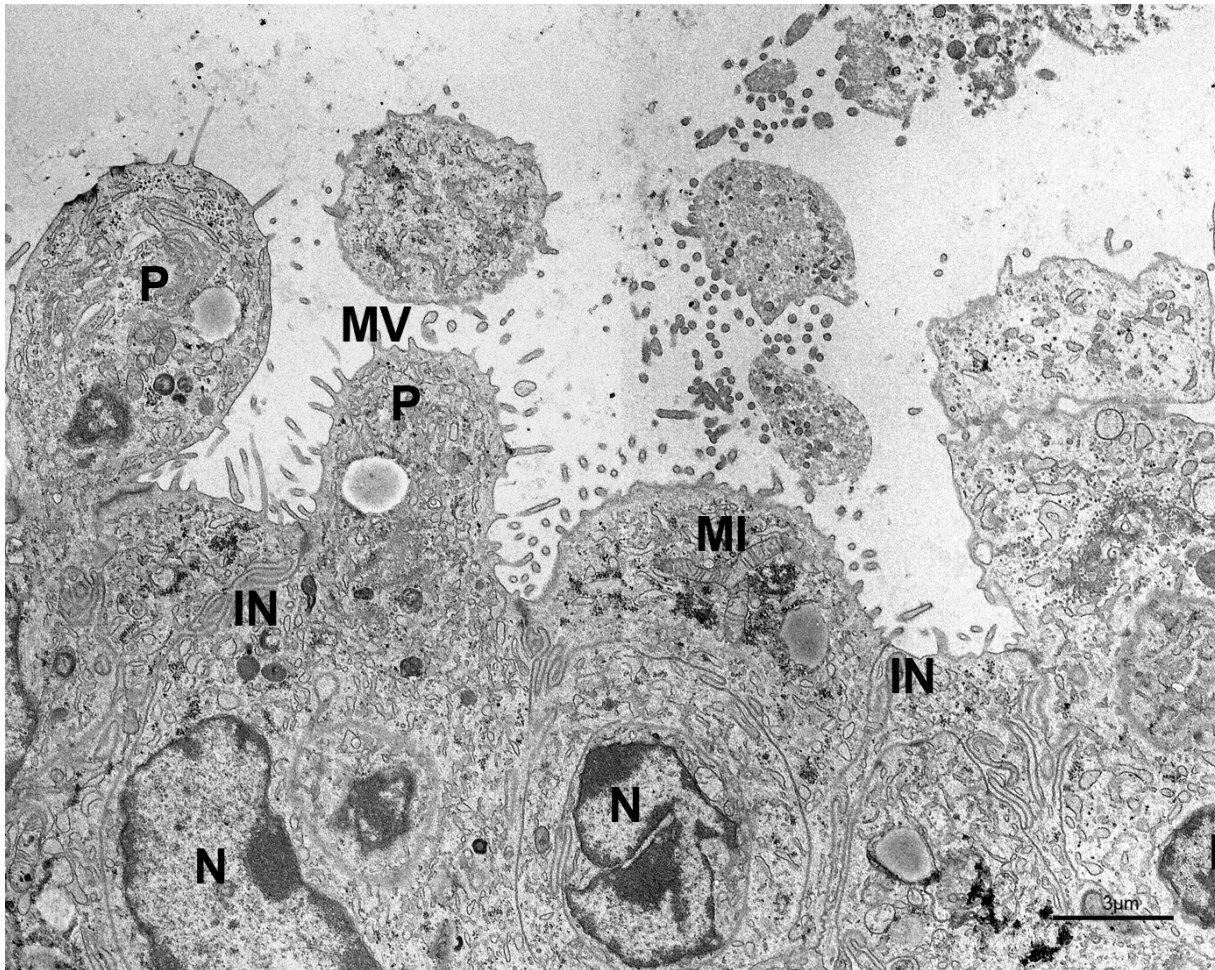
**Abb. 35** Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) am Tag 2 der Kultur.

Vereinzelt sind in sekretorischen Zellen Anzeichen für Ziliogenese zu erkennen.

BK = Basalkörperchen, D = Desmosomen, Deu = Deuteriosomen, TJ = „tight junctions“, JC = „junctional complexes“, N = Nukleus, SG = sekretorische Granula, MV = Mikrovilli, Z = Zilien, RER = raues endoplasmatisches Retikulum.

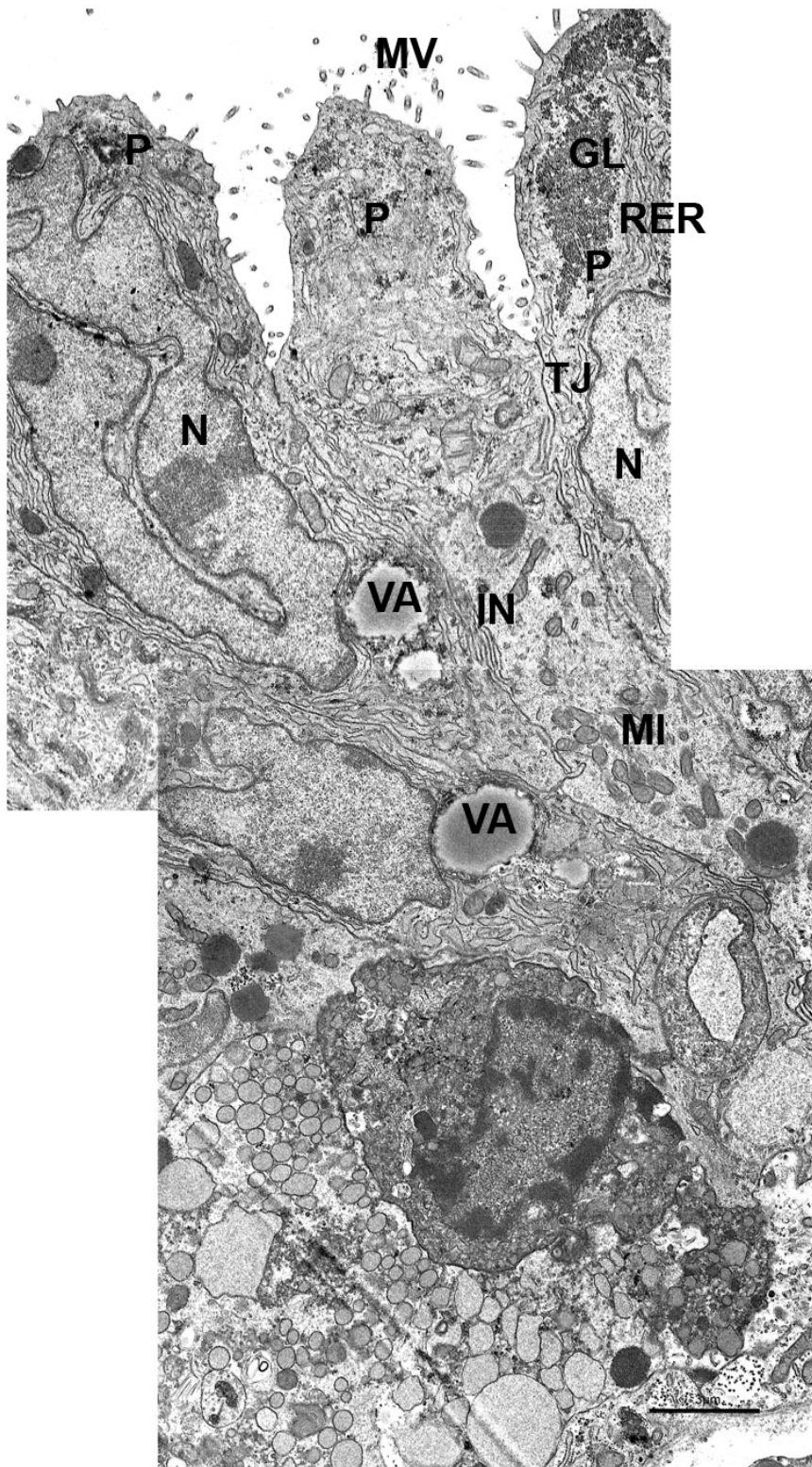
Am Tag 4 sind relativ wenig Zilienzellen zu beobachten. Sie enthalten supranukleär in ihrem Zytoplasma zahlreiche Mitochondrien. Es scheint, dass ein Teil der Mitochondrien ihre Cristae verlieren. Es gibt auch keine deutlichen Anzeichen für eine Ziliogenese wie am Tag 0 und Tag 2. Die Zellkerne der Zilienzellen haben eine relativ glatte Kontur und sehen intakt aus. Die sekretorischen Zellen haben zahlreiche intakte Mikrovilli. Sie besitzen auch relativ viel, meistens dilatiertes RER und die Zellkerne sind gut erhalten. Es sind nur wenige sekretorische Granula zu finden. Weiter sind verschiedene Arten von Protrusionen zu beobachten. Manche enthalten nur Granula und Vakuolen, andere auch Zellorganelle und Zellkerne. Hauptsächlich im basalen Epithelbereich kommen zahlreiche Lysosomen, relativ große Glykogenansammlungen und verschiedene Arten von Vakuolen vor. Dabei können Vakuolen mit hellem Rand und homogenem Inhalt (Lipidvakuolen) und solche, die von einer doppelten Membran umrandet sind, unterschieden werden. Die Zellverbindungen sind intakt und die Zellen liegen dicht aneinander.





**Abb. 36** Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4

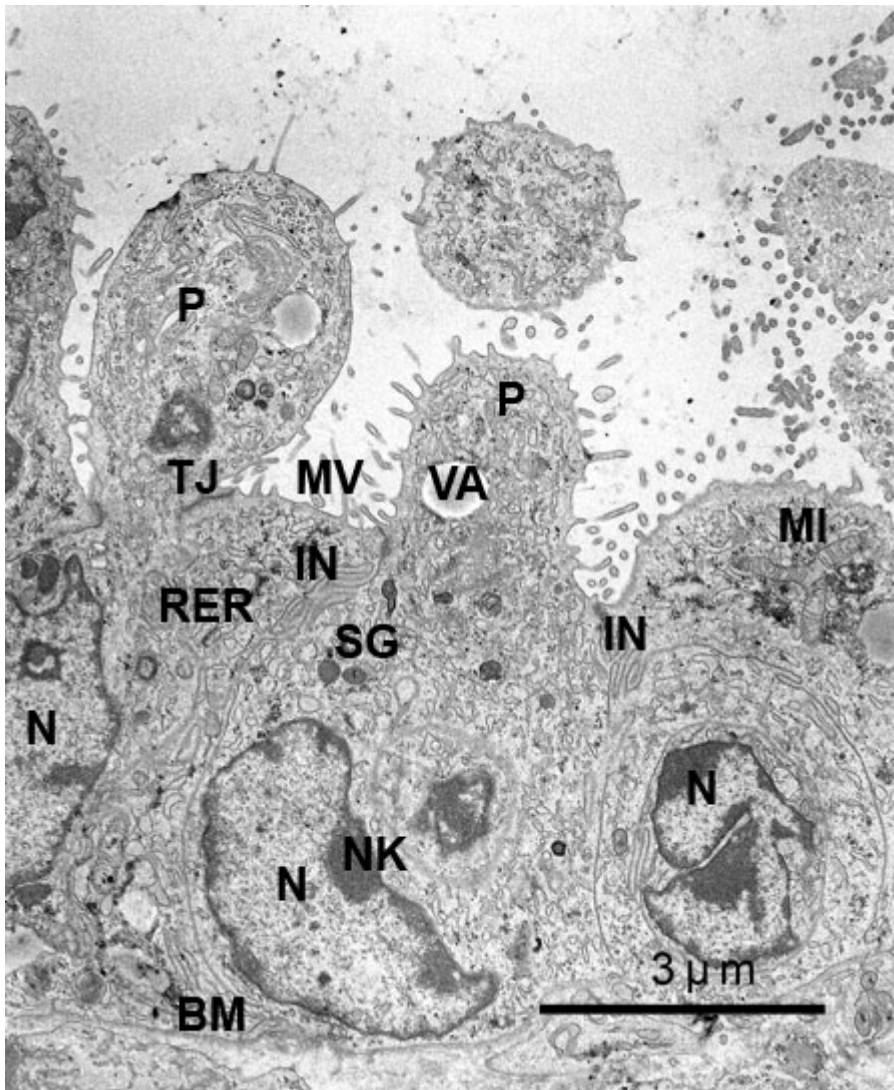
Innerhalb des Epithels trägt der größte Anteil der sekretorischen Zellen zellorganellreiche Protrusionen (P). Die Kerne (N) sind länglich bis oval und weisen auffällige Einkerbungen auf. IN = Invagination, MI = Mitochondrien.



**Abb. 37** Kernhaltige Protrusionen der sekretorischen Zellen aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur.

Neben zellorganellreichen Protrusionen (P) treten im Eileiterepithel am Tag 4 kernhaltige Protrusionen auf. GL = Glykogenansammlung, IN = Invagination, MV = Mikrovilli, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, P = Protrusion, RER = raues endoplasmatisches Retikulum, TJ = „tight junctions“, VA = Vakuolen.

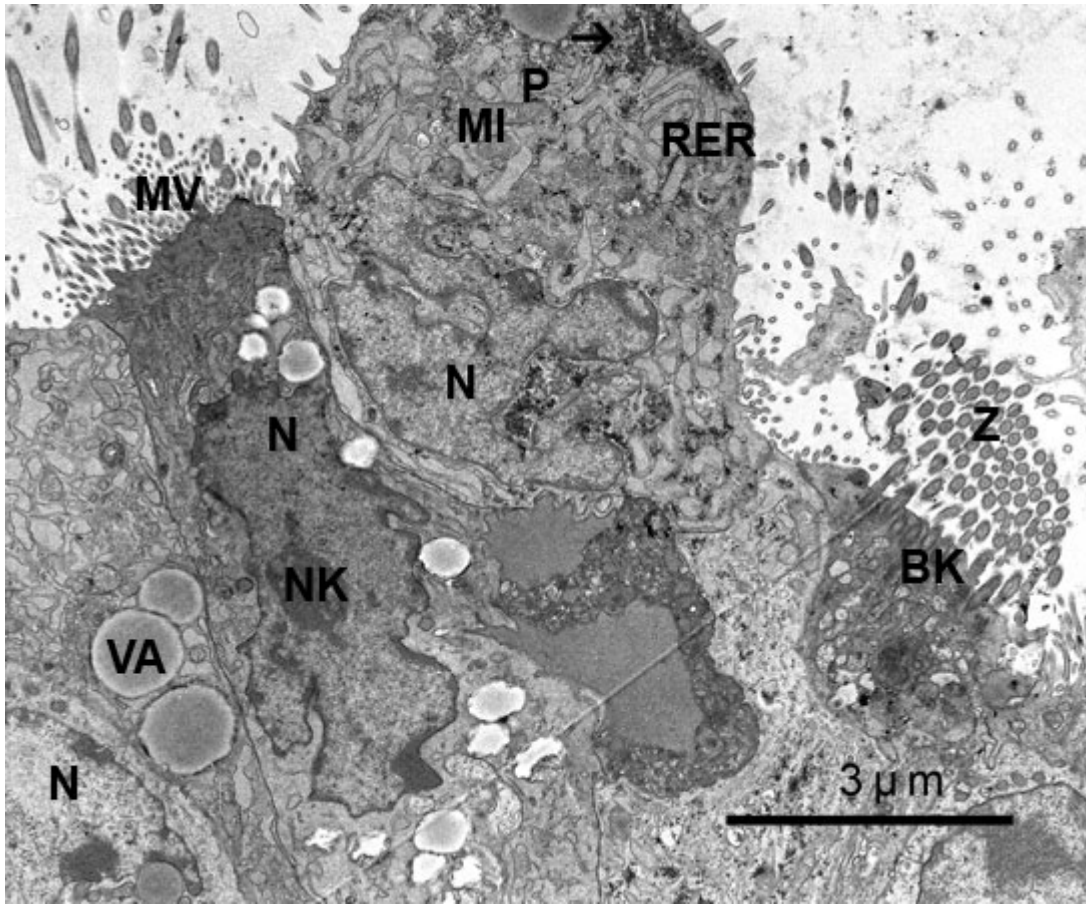




**Abb. 38** Sekretorische Zellen im Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur.

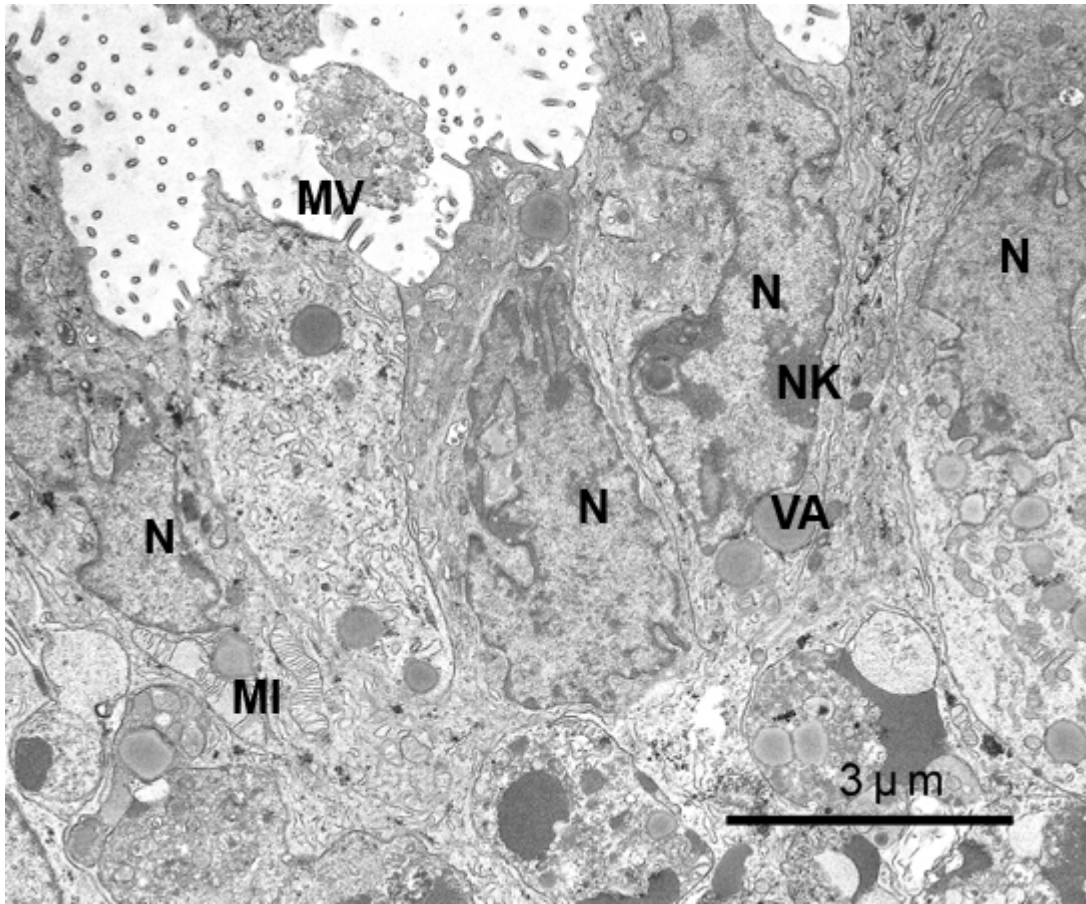
Innerhalb der sekretorischen Zellen kommt viel raues ER (RER) vor, welches auch in den Protrusionen (P) zu finden ist. An der Oberfläche sind fingerförmige Mikrovilli (MV) erkennbar. Im Zytoplasma sind nur wenige sekretorische Granula (SG) zu beobachten.

BM = Basalmembran, MI = Mikrovilli, N = Nukleus, NK = Nukleolus, TJ = „tight junctions“.



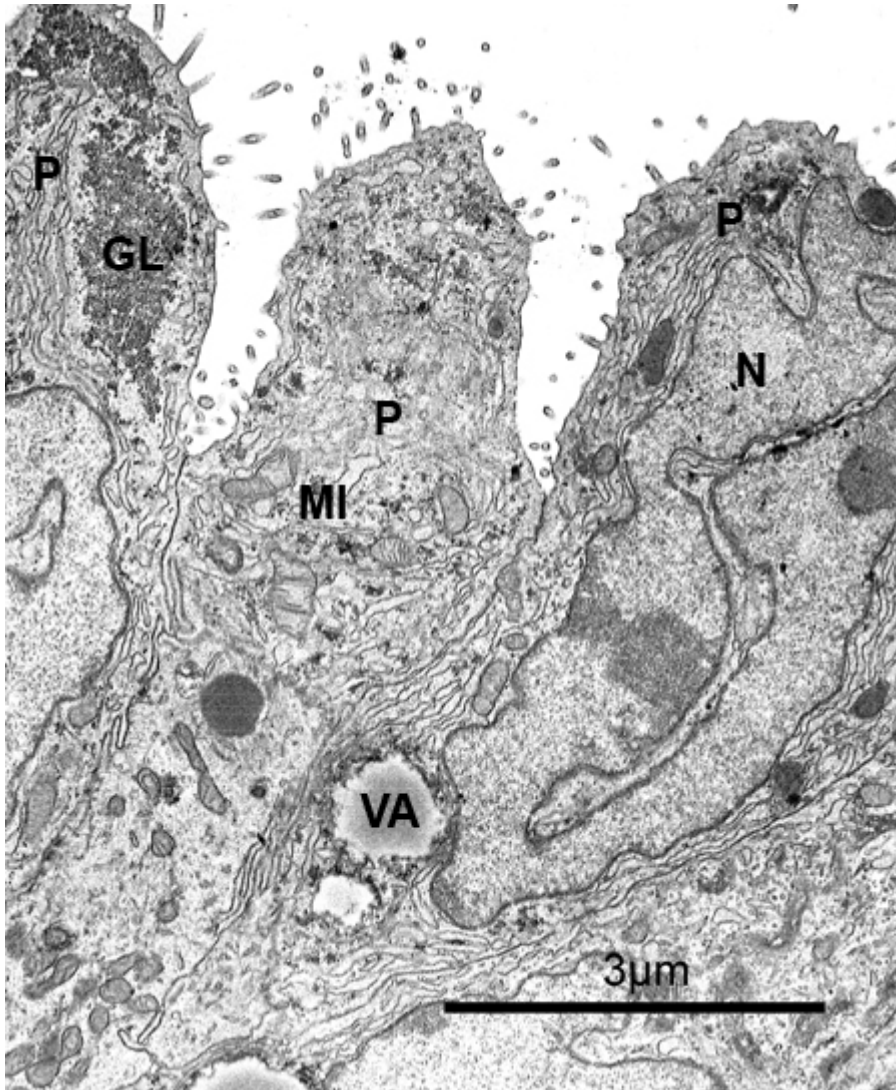
**Abb. 39** Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur.

Innerhalb des Epithels sind zilentragende und sekretorische Zellen zu unterscheiden. Auffallend ist die große Anzahl an lysosomalen Vakuolen (VA) im Zytoplasma der zilentragenden Zelle. Die Protrusion (P) der sekretorischen Zelle enthält Zellorganelle wie Mitochondrien (MI) und raues ER (RER) als auch einen unregelmäßig geformten Zellkern (N) und zahlreiche Glykogenaggregate (Pfeil). BK = Basalkörperchen, MV = Mikrovilli, NK = Nukleolus, Z = Zilien.



**Abb. 40** Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur.

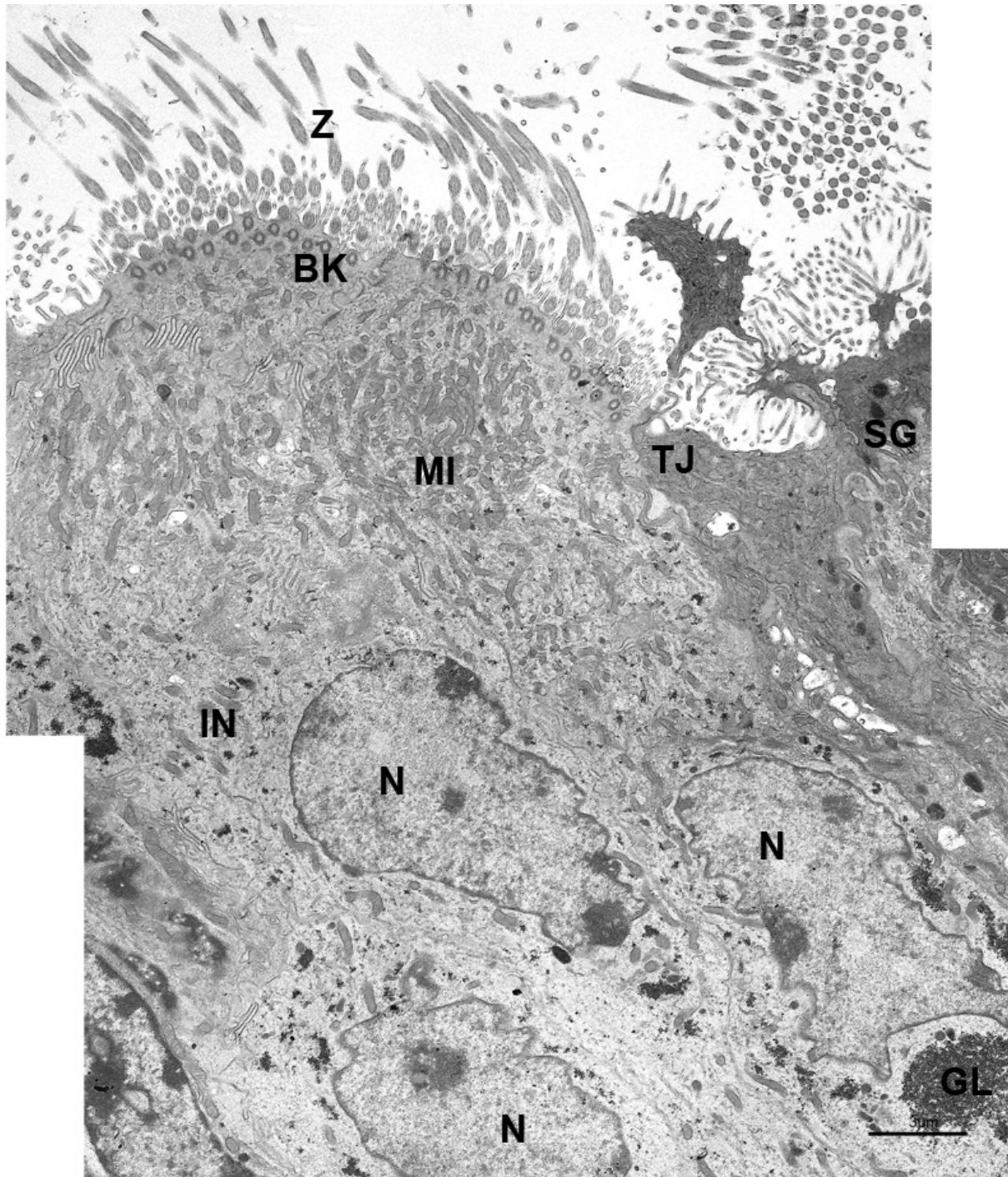
Im basalen Zytoplasma der Eileiterepithelzelle sind große Autolysosomen mit heterogenem Inhalt erkennbar. Auffällig sind außerdem dilatierte Mitochondrien (MI). Desweiteren sind Vakuolen (VA) mit hellem Rand und homogenem Inhalt sowie Vakuolen, welche von einer doppelten Membran begrenzt werden, zu unterscheiden. MV = Mikrovilli, N = Nukleus, NK = Nukleolus.



**Abb. 41** Sekretorische Zellen im Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur.

Innerhalb des Epithels sind sekretorische Zellen zu erkennen, welche sich aus dem Zellverband lösen. GL = Glykogenansammlung, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, P = Protrusion, VA = Vakuole.

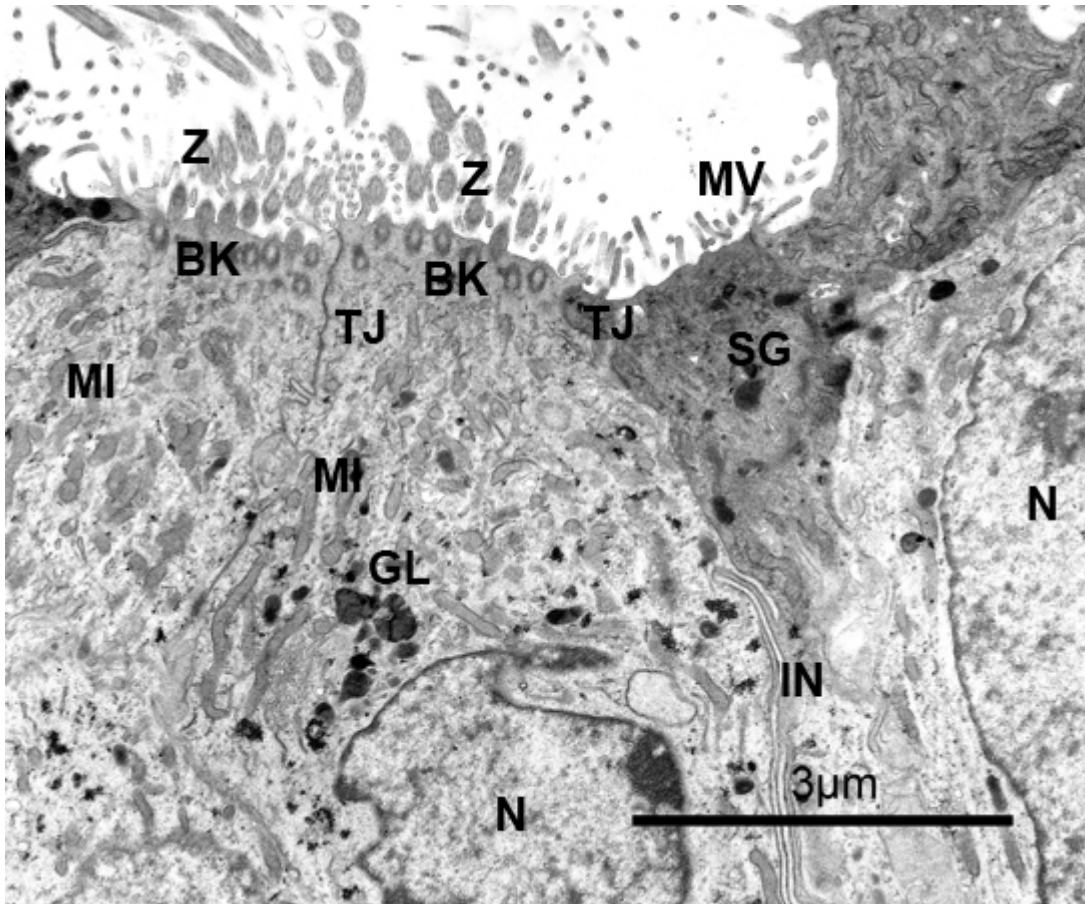
Am Tag 7 erscheint die Anzahl von Vakuolen und Autolysosomen im Vergleich zu Tag 4 geringer. Es sind mehr Zilienzellen verglichen mit Tag 4 zu beobachten, die zum Teil auch Deuterosomen aufweisen. Die Oberflächenstrukturen der Zellen sind gut erhalten. Die Zilienzellen sind von den sekretorischen Zellen gut zu unterscheiden. Es sind auch vermehrt sekretorische Granula im Vergleich zum Tag 4 zu finden. Es kommen weniger Protrusionen vor. Eine interessante Beobachtung ist eine Protrusion, die eine Vakuole mit Zilienanschnitten enthält. Dies wurde in den vorangegangenen Tagen nicht beobachtet. Die Zellen liegen dicht aneinander und die Zellverbindungen erscheinen intakt. Es sind „tight junctions“, Invaginationen und Desmosomen zu finden. Die Basalmembran ist intakt, glatt und ohne Unterbrechungen.



**Abb. 42** Zilientragende Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur.

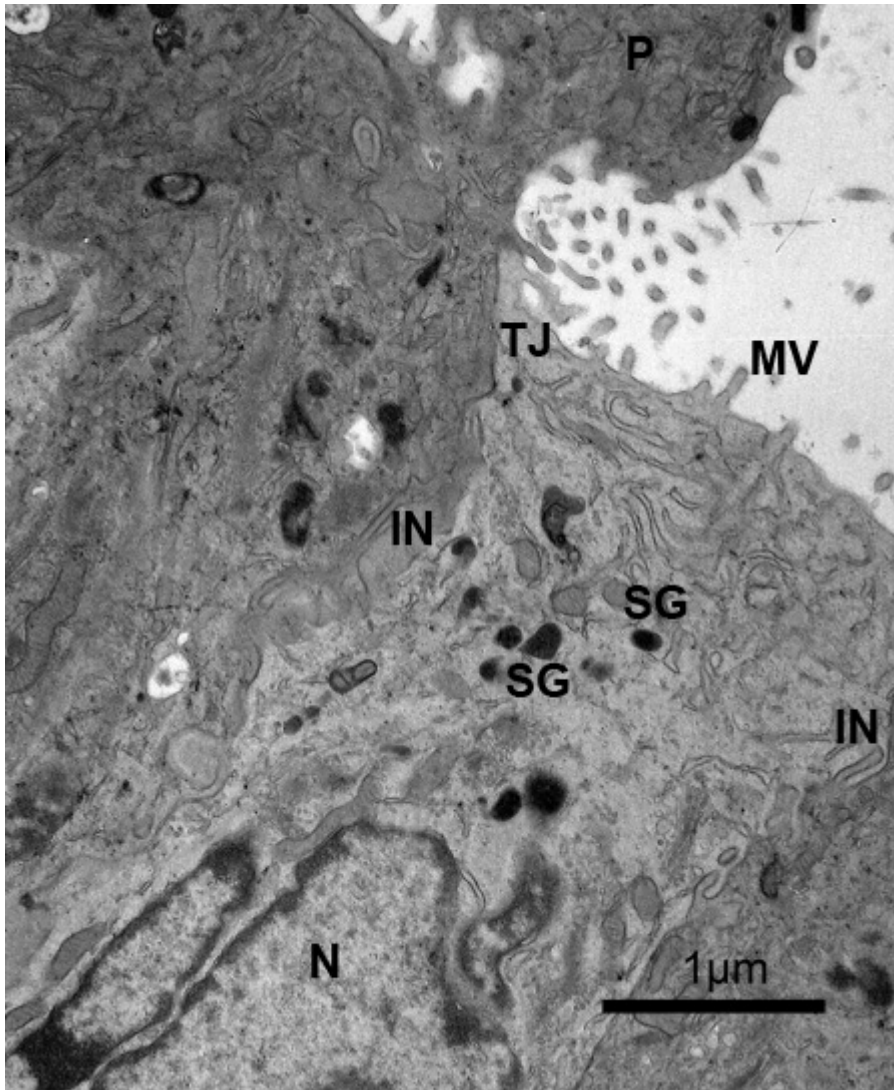
Unter der apikalen Zellmembran sind gut ausgebildete Basalkörperchen (BK) und Anzeichen für Ziliogenese erkennbar. Zudem sind im supranukleären Zytoplasma der Zilienzellen zahlreiche Mitochondrien (MI) vom Cristae Typ zu finden. GL = Glykogenansammlung, IN = Invagination, N = Nukleus, SG = sekretorische Granula, TJ = „tight junctions“, Z = Zilien.





**Abb. 43** Sekretorische und zilientragende Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur.

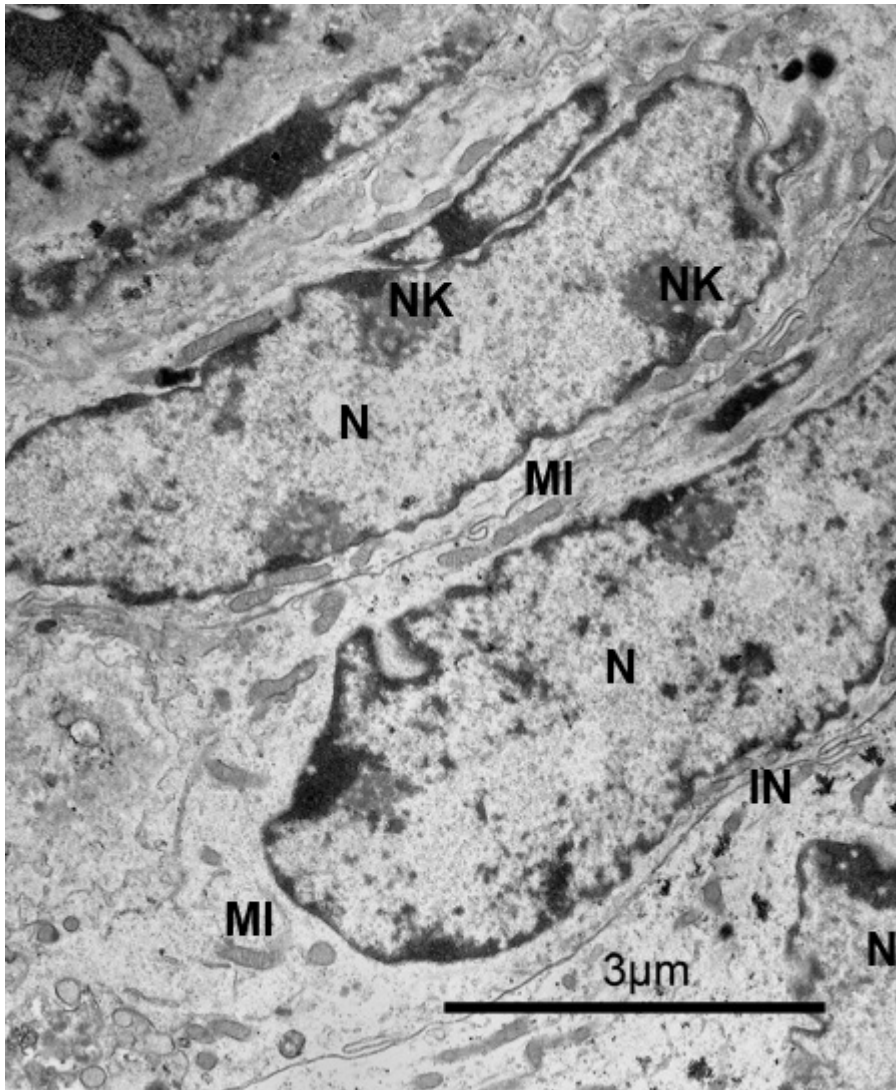
Der apikale Epithelbereich der zilientragenden und der sekretorischen Zellen erscheint auf gleicher Ebene zu liegen. Als Oberflächenstrukturen sind Kinozilien und Mikrovilli (MV) erkennbar. Innerhalb der sekretorischen Zellen sind sekretorische Granula (SG) sichtbar. BK = Basalkörperchen, GL = Glykogenansammlung, MI = Mitochondrien, N = Nukleus, TJ = „tight junctions“, Z = Zilien, IN = Invagination.



**Abb. 44** Sekretorische Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur der Kultur.

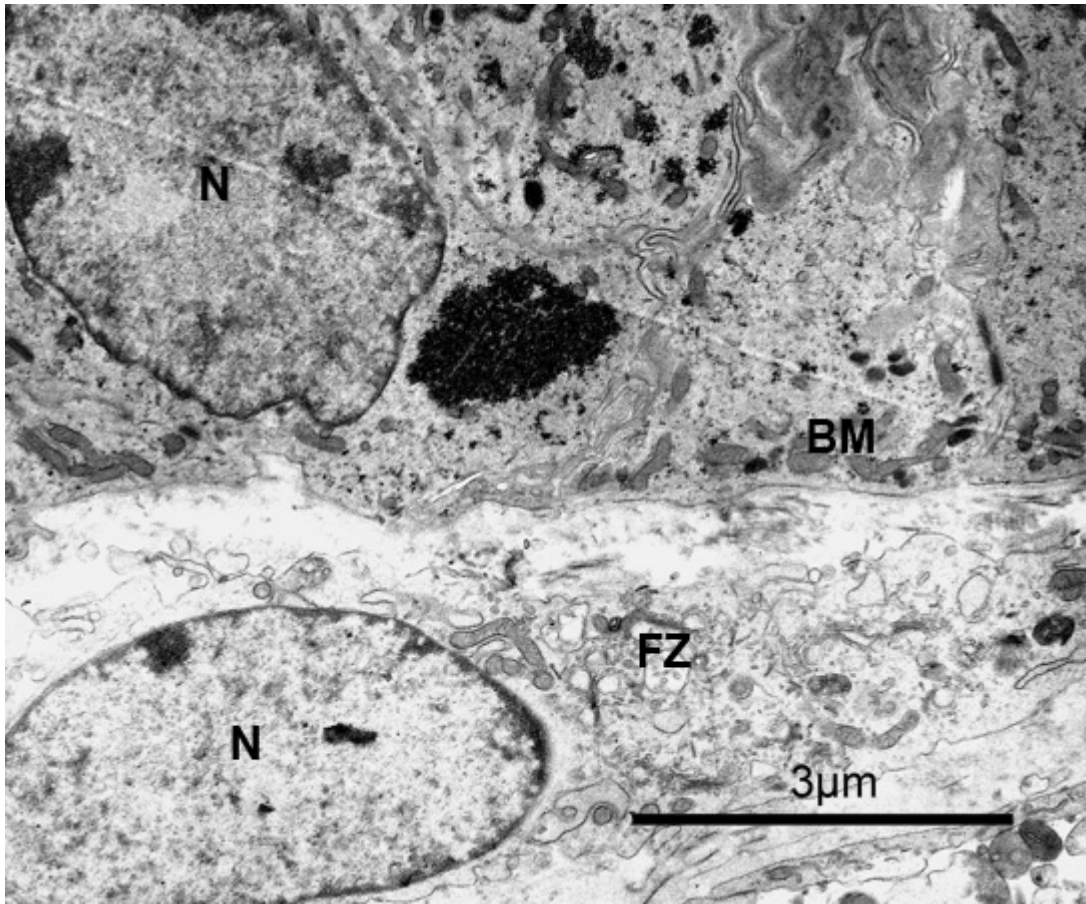
Die sekretorischen Zellen tragen nur vereinzelte Protrusionen (P), welche über einen schmalen Zytoplasmasteg mit der dazugehörenden Zelle verbunden sind. IN = Invagination, MV = Mikrovilli, N = Nukleus, SG = sekretorische Granula, TJ = „tight junctions“.





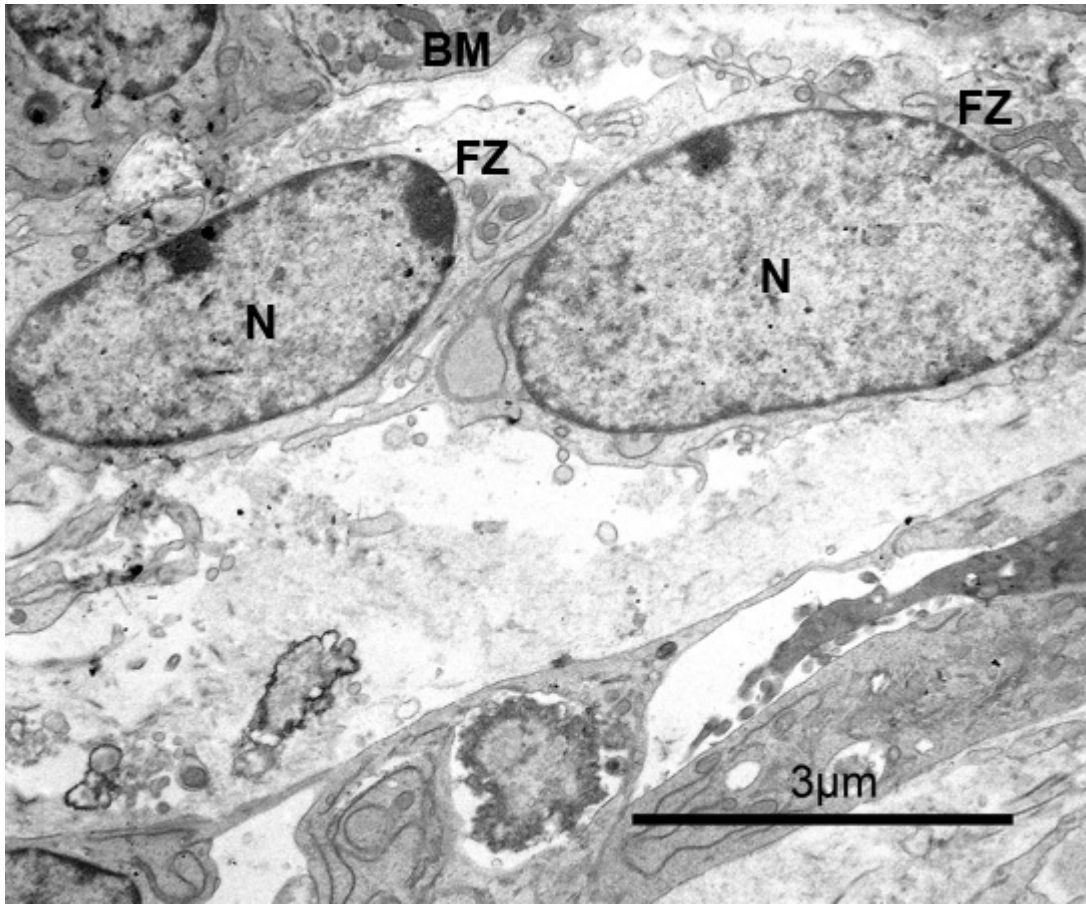
**Abb. 45** Ausschnitt aus dem Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur.

Im basalen Zytoplasma der Epithelzellen sind nur wenige Zellorganellen zu beobachten. Zudem stehen die Zellen über Invaginationen (IN) in engem Kontakt zueinander. Die Zellkerne (N) sind schmal und weisen etwas Heterochromatin auf. MI = Mitochondrien, NK = Nukleolus.



**Abb. 46** Basallamina des Eileiterepithels des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur.

Die Eileiterepithelzellen sitzen einer gut ausgebildeten, durchgehenden Basalmembran (BM) auf. GL = Glykogenansammlung, FZ = Fibrozyt, N = Nukleus.



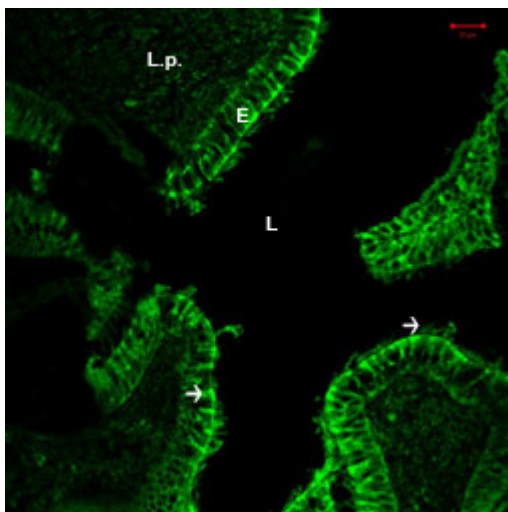
**Abb. 47** Bindegewebe des Eileiterepithels des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur.

Das Bindegewebe erscheint locker strukturiert. Die Fibrozyten (FZ) besitzen nur einen zellorganellarmen schmalen Zytoplasmasaum und einen großen ovalen Kern (N), welcher meist 1-3 randständige Nukleoli enthält. BM = Basalmembran.

## 4.4 Glykohistochemische Untersuchungen am bovinen Eileiter

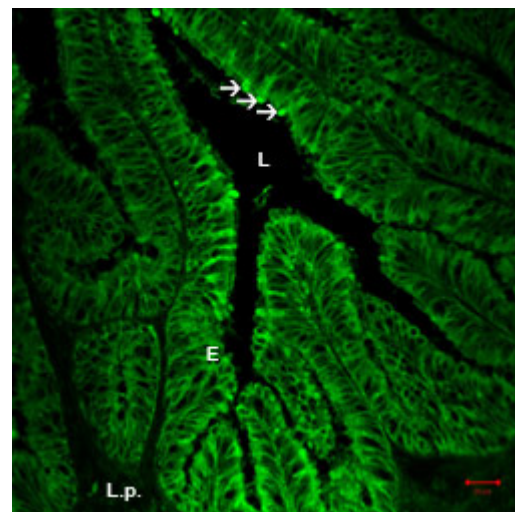
### 4.4.1 Bindungsstellen für *Canavalia ensiformis* Agglutinin (Con A)

Sowohl die Zilienzellen als auch die sekretorischen Zellen des bovinen Eileiterepithels zeigen eine deutlich positive (++) Bindung von Con A. Im gesamten Zytoplasmabereich sind zahlreiche, stark positive Granula zu beobachten. Auch die Zilien der Zellen reagieren stark positiv (+++) mit Con A. Die Basalzellen und Hauptzellen des Eileiterepithels weisen im gesamten Zytoplasma aller Segmente Bindungsstellen für Con A auf, jedoch ist die Reaktion im Zytoplasma der Basalzellen besonders auffallend. Die Protrusionen der sekretorischen Zellen zeigen eine stark positive (+++) Reaktion mit Con A. Im Gegensatz dazu weist das Bindegewebe eine weniger intensive Färbung (+) auf. Die Basalmembran ist gut dargestellt. Die Intensität der Reaktion bleibt während der gesamten Kulturperiode relativ unverändert.



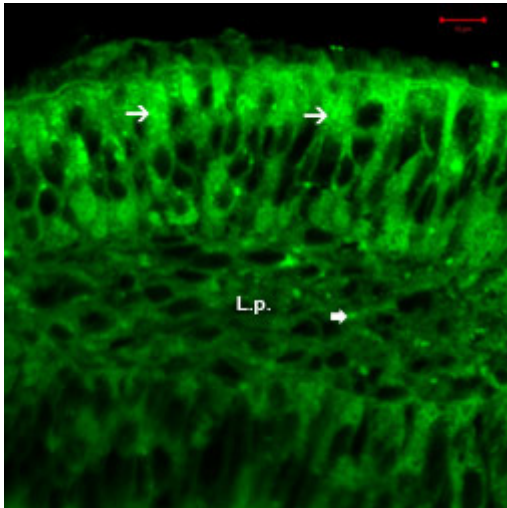
**Abb. 48** Con A-Bindung im Isthmus am Tag 0, SB = 20µm

Das gesamte Epithel (E) im Isthmus weist Bindungsstellen für Con A auf; die apikale Glykokalix und die Zilien der Zilienzellen sind stark positiv (Pfeil). L.propria = (L.p.).



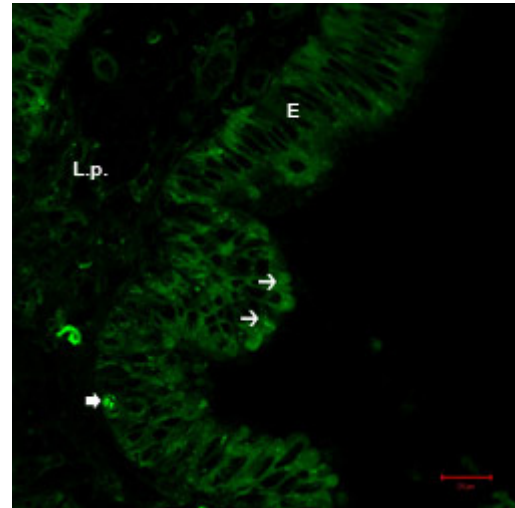
**Abb. 49** Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 0, SB = 20µm

Das gesamte Epithel (E) in der Ampulla weist Bindungsstellen für Con A auf; die apikale Glykokalix und die Protrusionen der sekretorischen Zellen sind stark positiv (Pfeil). L.propria = (L.p.).



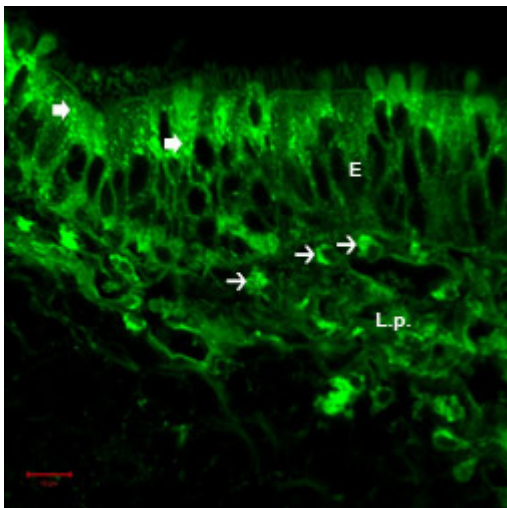
**Abb. 50** Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 2, SB = 10μm

Das gesamte Epithel (E) der Ampulla weist Bindungsstellen für Con A auf. Im supranukleären Bereich der Zellen sind stark positive Granula zu beobachten (Pfeil). In der L.propria (L.p.) befinden sich vereinzelt auch stark positive Granula (großer Pfeil).



**Abb. 51** Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 4, SB = 20μm

Das gesamte Epithel (E) der Ampulla weist Bindungsstellen für Con A auf. Die Protrusionen der sekretorischen Zellen sind deutlich positiv (Pfeil). Im basalen Bereich des Epithels befinden sich vereinzelt stark positive Lymphozyten (großer Pfeil), L.propria = L.p.



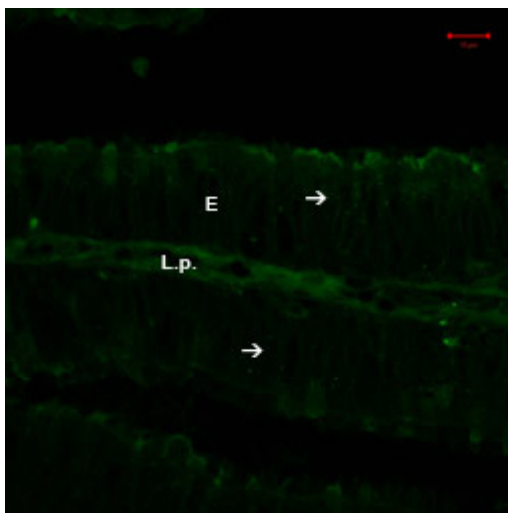
**Abb. 52** Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 7, SB = 10μm

Das gesamte Epithel (E) der Ampulla weist Bindungsstellen für Con A auf. Im supranukleären Bereich der Zellen sind stark positive Granula zu beobachten (großer Pfeil). In der L.propria (L.p.) befinden sich stark positive Lymphozyten (Pfeil).



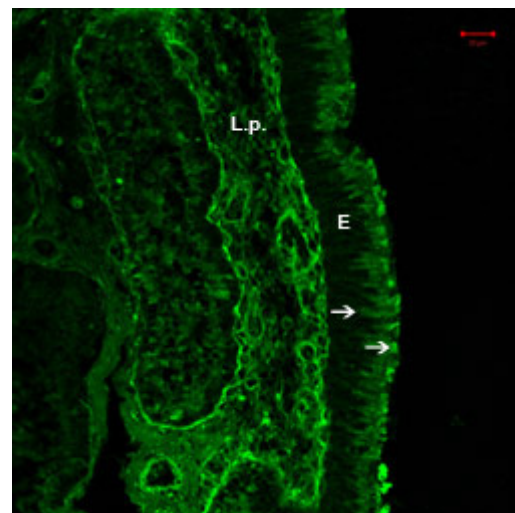
#### 4.4.2 Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Der apikale Epithelsaum des Eileiterepithels zeigt eine deutlich positive (++) Reaktion. Das Epithel reagiert weiter basal an manchen Stellen schwach positiv (+). Im Isthmus ist die Reaktion an der apikalen Oberfläche des Epithels stark positiv (+++) im Vergleich zur Ampulla. Die Zilien der Zilienzellen und die Protrusionen der sekretorischen Zellen zeigen ebenfalls eine stark positive (+++) Reaktion. Das Bindegewebe, die Basalmembran und die Gefäße sind intensiver gefärbt als die Epithelschicht. Bei einem Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 7 ist zu beobachten, dass die Reaktion im Epithel schwächer wird und sich im Gegensatz dazu die Reaktion im Bindegewebe, in der Basalmembran und in den Gefäßen intensiviert.



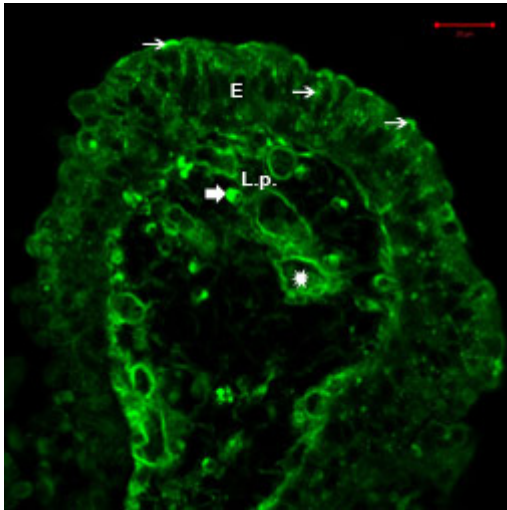
**Abb. 53** PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 10µm

Der apikale Epithelsaum des Eileiterepithels zeigt eine positive Reaktion für PSA. Vereinzelt sind im supranukleären Zytoplasma der Eileiterepithelzellen positive Granula (Pfeil) zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L. p.



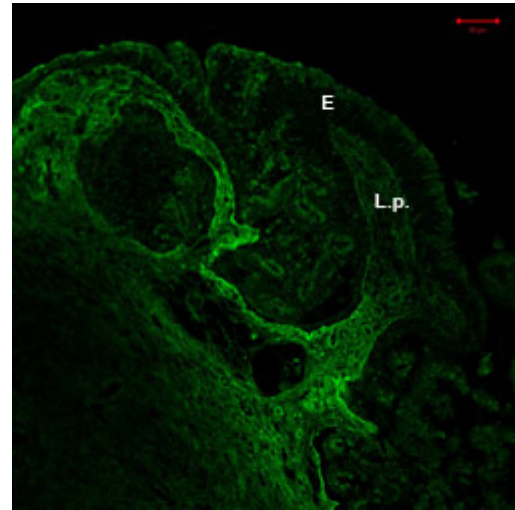
**Abb. 54** PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 20µm

Die apikale Eileiterepitheloberfläche (Pfeil) zeigt eine positive Reaktion für PSA. Auch im supranukleären Zytoplasma der Zellen befinden sich positive Granula (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L. p.



**Abb. 55** PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20µm

Am Tag 4 zeigt der apikale Epithelsaum (Pfeil) des Eileiterepithels auch eine positive Reaktion für PSA. Im supranukleären Zytoplasma der Eileiterepithelzellen sind positive Granula (Pfeil) zu beobachten. In der Lamina propria (L.p.) finden sich deutlich positive Gefäße und Lymphozyten (großer Pfeil). Epithel = E.

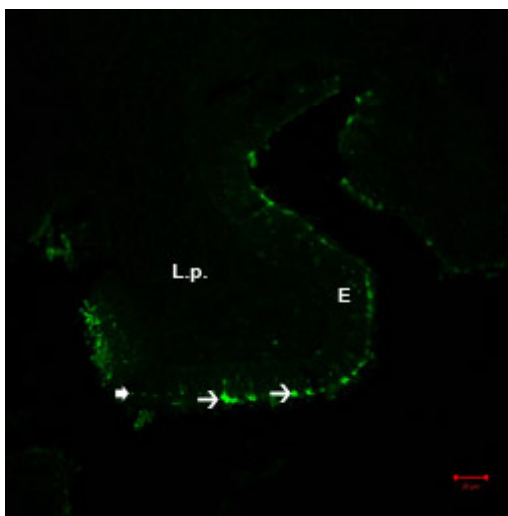


**Abb. 56** PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 50µm

Am Tag 7 zeigt die apikale Oberfläche des Eileiterepithels (E) eine schwach positive Reaktion. Lamina propria = L.p.

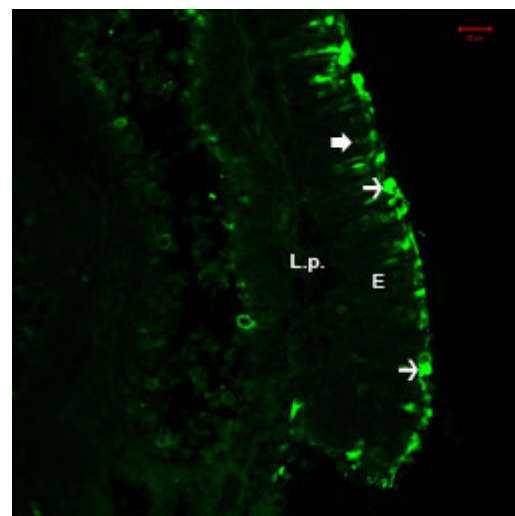
#### 4.4.3 Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA)

Die Eileiterepitheloberfläche zeigt eine starke Reaktion mit UEA. Am intensivsten reagieren die Oberflächenstrukturen der Zellen, die Zilien und die Mikrovilli. Die Protrusionen der sekretorischen Zellen weisen ebenso eine stark positive (+++) Färbung auf. Das Bindegewebe zeigt eine schwach positive (+) Reaktion an. Die Basalmembran ist negativ (-).



**Abb. 57** UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 20μm

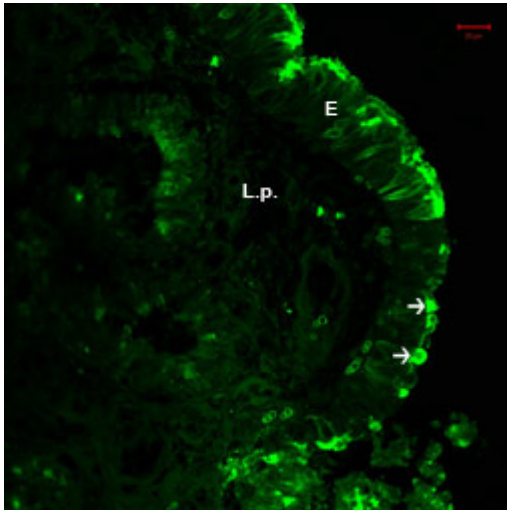
Die Eileiterepitheloberfläche weist eine starke Reaktion mit UEA auf. Am intensivsten reagieren die Kinozilien der Zilienzellen und die Mikrovilli der sekretorischen Zellen (Pfeil). Ebenso eine stark positive Reaktion zeigen supranukleär gelegene Granula (großer Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 58** UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 20μm

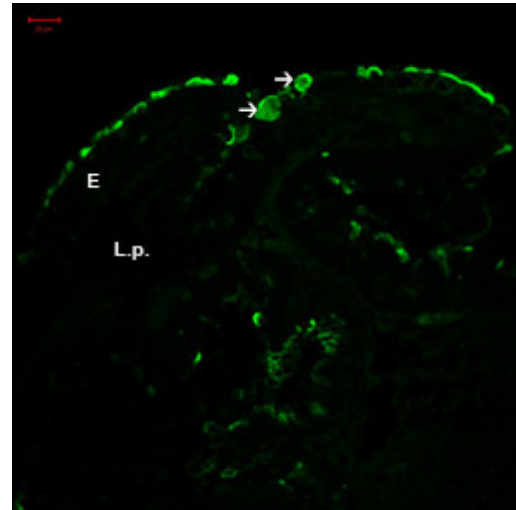
Am Tag 2 zeigt die Eileiterepitheloberfläche auch eine starke Reaktion mit UEA. Im Zytoplasma der Eileiterepithelzellen finden sich stark positive Granula (großer Pfeil). Die Protrusionen (Pfeil) der sekretorischen Zellen weisen ebenso eine stark positive Reaktion auf. Epithel = E, Lamina propria = L.p.





**Abb. 59** UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20µm

Am Tag 4 sind sowohl stark positive Oberflächenstrukturen als auch Protrusionen (Pfeil) zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L.p.

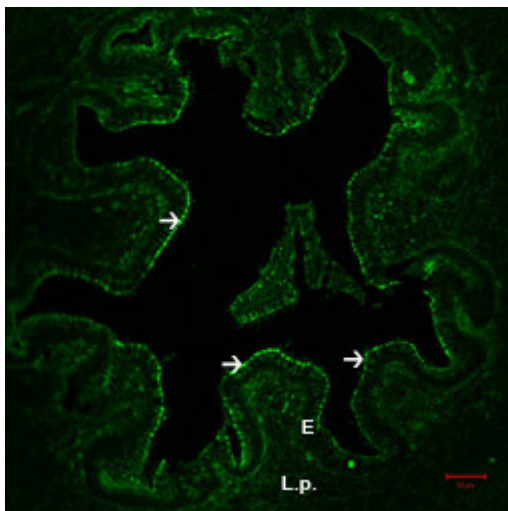


**Abb. 60** UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 20µm

Am Tag 7 sind sowohl die Zilien und Mikrovilli der Eileiterepithelzelle, als auch ihre Protrusionen (Pfeil) stark positiv. Epithel = E, Lamina propria = L.p.

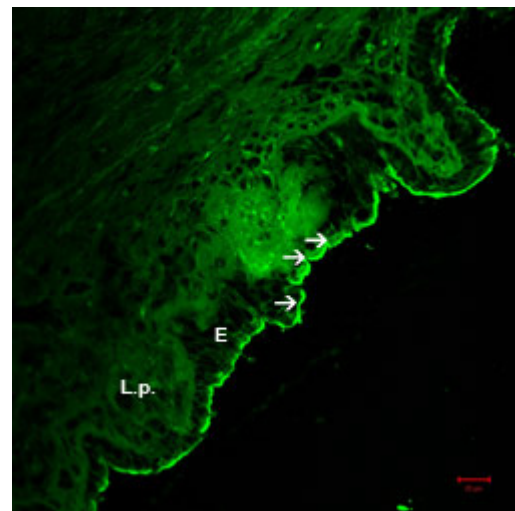
#### 4.4.4 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

WGA-Bindungsstellen treten im Eileiterepithel als stark positiver Epithelsaum in Erscheinung. Auch das Zytoplasma reagiert, vor allem im apikalen Bereich, stark positiv. Die Zilien und die Mikrovilli reagieren in allen Segmenten stark positiv. Außerdem reagieren die Protrusionen sehr intensiv (+++). Es sind intensiv gefärbte Granula im Zytoplasma der Hauptzellen zu erkennen, die hauptsächlich im apikalen Bereich lokalisierbar sind. Das Bindegewebe, die Basalmembran und die Gefäße zeigen eine deutlich positive (++) Reaktion.



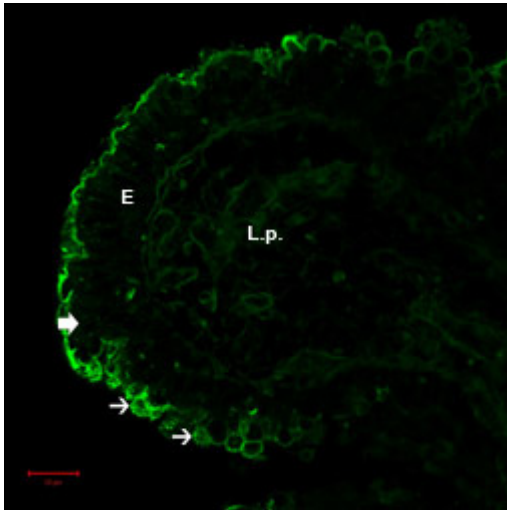
**Abb. 61** WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 50µm

Die apikale Oberfläche (Pfeil) des Eileiterepithels zeigt eine stark positive Reaktion mit WGA. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



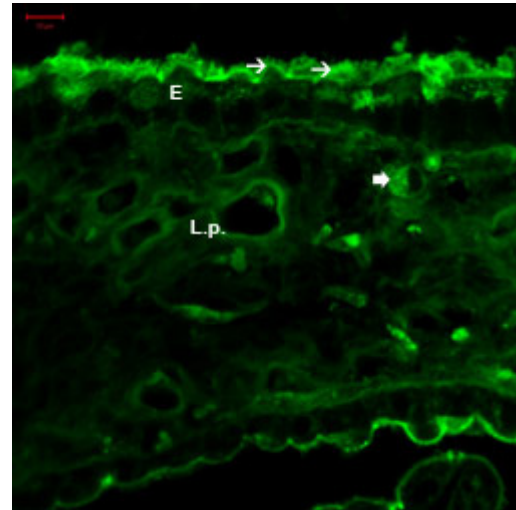
**Abb. 62** WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 20µm

Der apikale Epithelsaum (Pfeil) des Eileiters reagiert stark positiv. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 63** WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20µm

Die Golgi-Zone (großer Pfeil) des Eileiterepithels reagiert deutlich positiv. Der apikale Epithelsaum ist stark positiv (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.

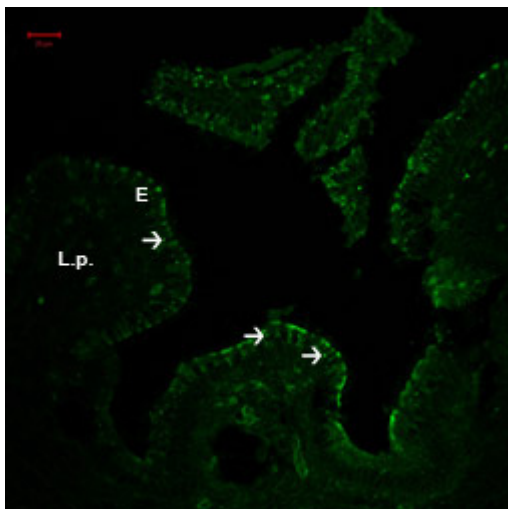


**Abb. 64** WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 10µm

Am Tag 7 weist die apikale Epithelzone des Eileiters (Pfeil) Bindungsstellen für WGA auf. In der Lamina propria (L.p) befinden sich deutlich positive Lymphozyten (großer Pfeil). Epithel = E.

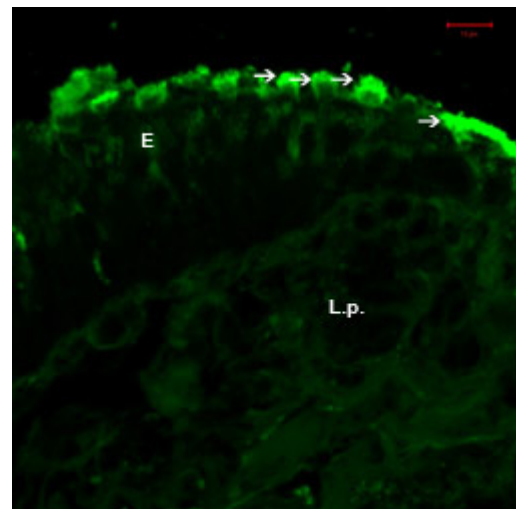
#### 4.4.5 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (succinyliert) (WGAs)

Im Eileiterepithel zeigen sich die Bindungsstellen für WGAs in einem stark positiv (+++) reagierenden apikalen Saum und stark positiven (+++) Kinozilien und Protrusionen. Zudem kommen schwach positive (+) basale Zytoplasmabereiche vor. Desweiteren fallen viele stark positiv (+++) reagierende Granula auf, die deutlich apikal zu lokalisieren sind. Das Bindegewebe und die Basalmembran zeigen eine schwach positive (+) Reaktion. Die Reaktionsstärke bleibt während der ganzen Kulturperiode gleich.



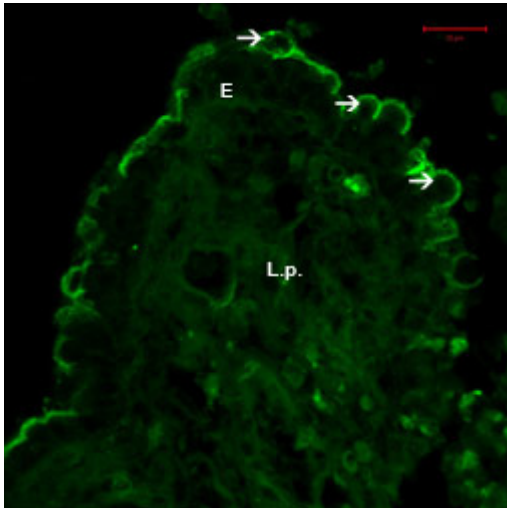
**Abb. 65** WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 20µm

Die apikale Eileiterepitheloberfläche und das supranukleäre Zytoplasma (Pfeil) der Epithelzellen sind stark positiv für WGAs. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



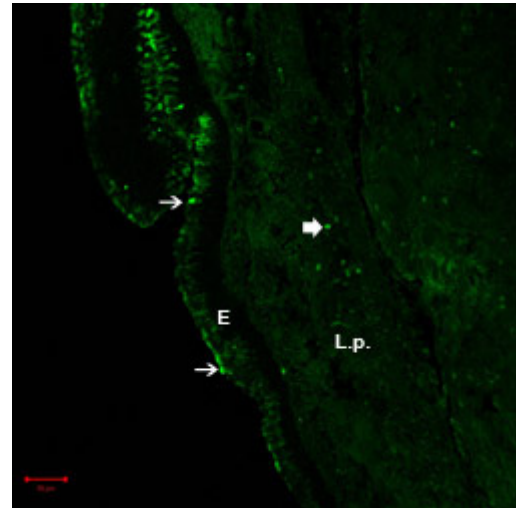
**Abb. 66** WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 10µm

Eine stark positive Reaktion ist in den apikalen Glykokalix (Pfeil) und in den Protrusionen (Pfeil) der sekretorischen Eileiterepithelzellen zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



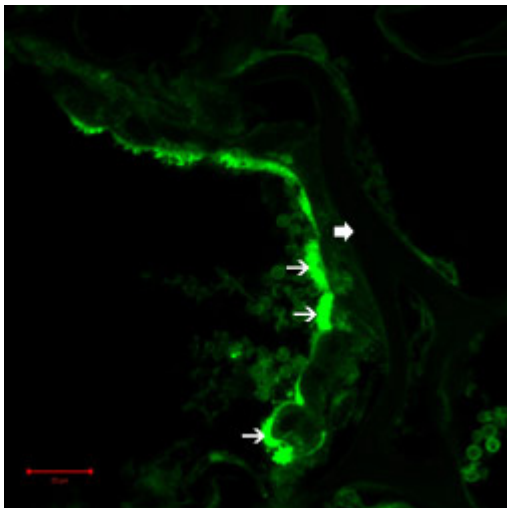
**Abb. 67** WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20μm

Es ist eine stark positive Reaktion in der apikalen Glykokalix (Pfeil) und an den apikalen Protrusionen (Pfeil) der sekretorischen Eileiterepithelzellen zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 68** WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 50μm

Die apikale Eileiterepitheloberfläche und das supranukleäre Zytoplasma (Pfeil) der Epithelzellen sind deutlich positiv für WGAs. In der Lamina propria (L.p) befinden sich vereinzelt stark positive Zellen. Epithel = E.

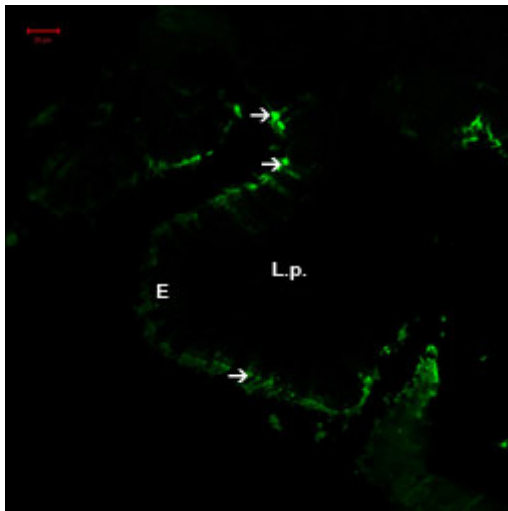


**Abb. 69** WGAs-Bindung im Zellulose-schwämmchen der Eileitergewebekultur am Tag 7, SB = 20μm

Im Kollagenschwämmchen der Kultur am Tag 7 sind Zellen mit stark positiver Reaktion an der apikalen Glykokalix zu beobachten (Pfeil). Kollagenschwämmchen (großer Pfeil).

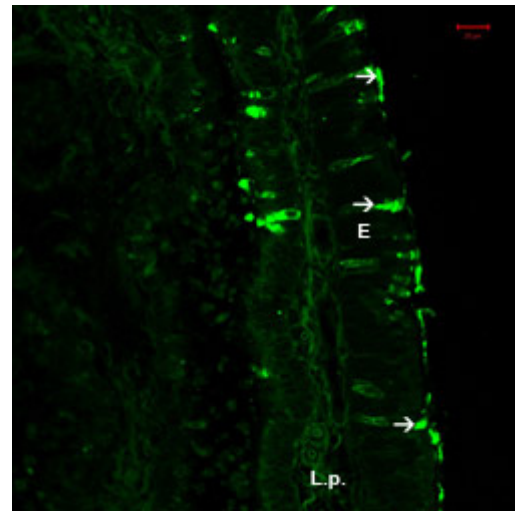
#### 4.4.6 Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Die apikalen Zellbereiche des Eileiterepithels reagieren schwach positiv (+). Das Zytoplasma einiger Zellen reagiert stark positiv (+++). Bei diesen Zellen zeigen dann auch der apikale Epithelsaum und die Zilien eine deutlich positive (++) Reaktion. Das Bindegewebe und die Basalmembran sind negativ (-).



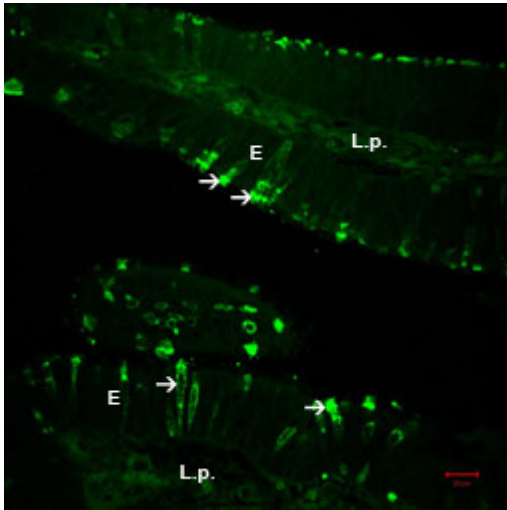
**Abb. 70** DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 20µm

Stark positive Reaktion an der apikalen Eileiterepitheloberfläche, vereinzelt auch im supranukleären Zytoplasmabereich der Epithelzellen (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.



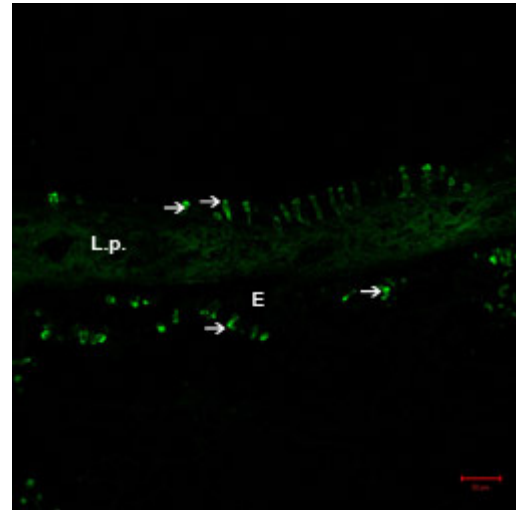
**Abb. 71** DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 20µm

Am Tag 2 ist die Reaktion an der apikalen Eileiterepitheloberfläche auch stark positiv. Vereinzelt kommen Epithelzellen vor, die im supranukleären Zytoplasmabereich stark positiv sind (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 72** DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20μm

Es ist eine stark positive Reaktion an der apikalen Eileiterepitheloberfläche zu beobachten, vereinzelt auch im supranukleären Zytoplasmabereich der Epithelzellen oder im gesamten Zytoplasma (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.



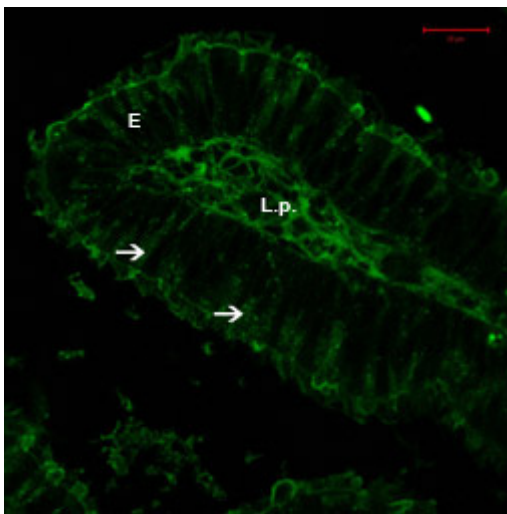
**Abb. 73** DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 50μm

Eine deutlich positive Reaktion ist an der apikalen Eileiterepitheloberfläche (Pfeil) und im supranukleären Zytoplasma zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



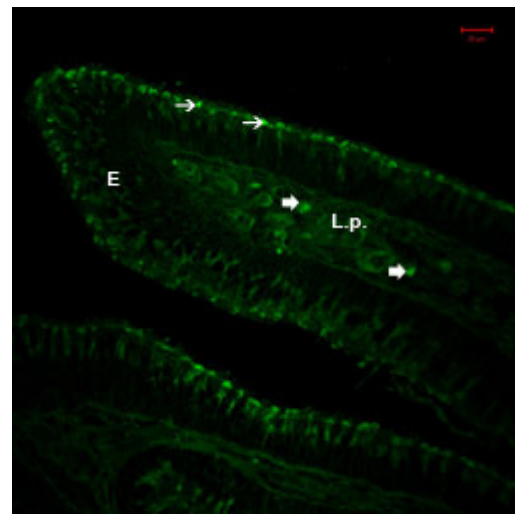
#### 4.4.7 Bindungsstellen für Ricinus communis Agglutinin (RCA)

Im Eileiterepithel reagieren hauptsächlich die sekretorischen Zellen und ihre Protrusionen positiv (++). Es sind fluoreszierende Granula im Zytoplasma der sekretorischen Zellen zu beobachten. Auch die Zilien der Zilienzellen zeigen eine schwach positive (+) Reaktion. Das Bindegewebe und die Basalmembran zeigen ebenfalls eine schwach positive (+) Reaktion.



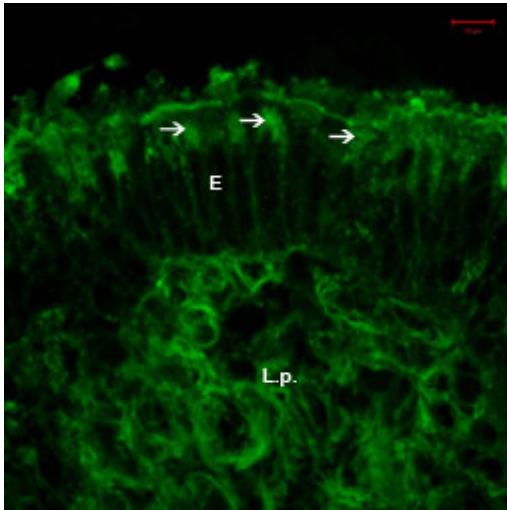
**Abb. 74** RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 20μm

Supranukleär befinden sich in den Eileiterepithelzellen deutlich positive Granula (Pfeil). Epithel = E, Lamina propria = L.p.



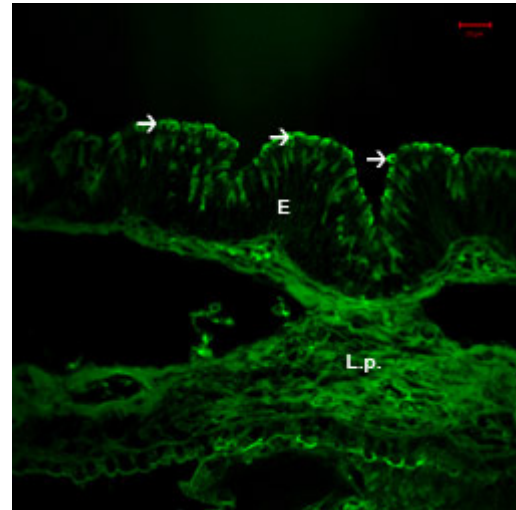
**Abb. 75** RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 20μm

Die Reaktion an der apikalen Eileiterepitheloberfläche ist stark positiv (Pfeil). In der Lamina propria (L.p.) sind deutlich positive Lymphozyten (großer Pfeil) zu beobachten. Epithel = E.



**Abb. 76** RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 10µm

Eine stark positive Reaktion ist in den supranukleären Bereichen (Pfeil) der Eileiterepithelzellen am Tag 4 zu beobachten. Epithel = E, Lamina propria = L.p.

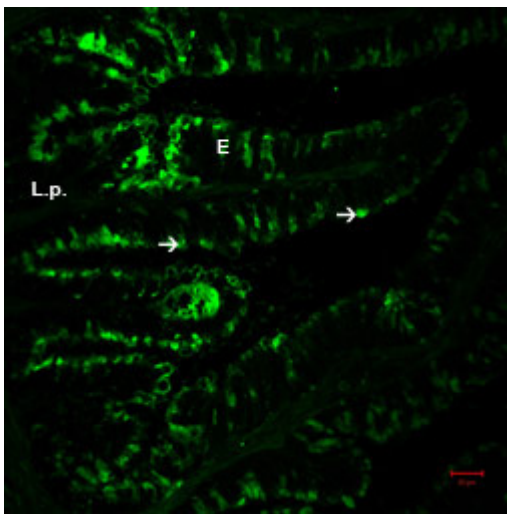


**Abb. 77** RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 20µm

Am Tag 7 ist die Reaktion im supranukleären Bereich der Eileiterepithelzellen und besonders an der apikalen Epitheloberfläche (Pfeil) stark positiv. Epithel = E, Lamina propria = L.p.

#### 4.4.8 Bindungsstellen für *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA)

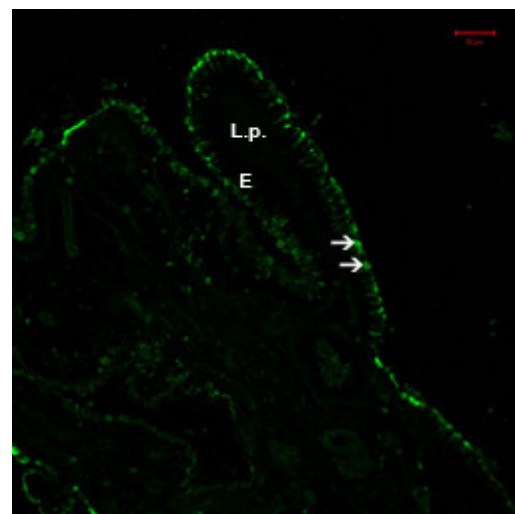
Im Eileiter ist eine stark positive Reaktion im apikalen Bereich der Epithelzellen und ihren Oberflächenstrukturen zu beobachten. Zudem kommen im apikalen Epithelanteil unterhalb des Saumes viele stark positive (+++) kleine Granula vor. Das Bindegewebe und die Basalmembran sind negativ (-).



**Abb. 78** PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0, SB = 20µm

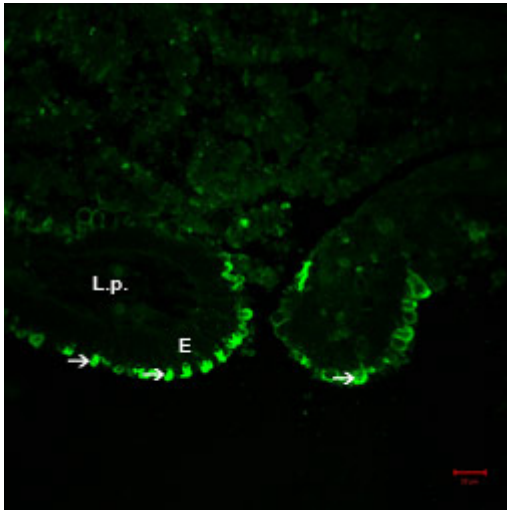
Der apikale Epithelsaum des Eileiters reagiert stark mit PNA (Pfeil). Ebenso ist eine stark positive Reaktion im supranukleären Zytoplasma der Eileiterepithelzellen zu beobachten.

Epithel = E, Lamina propria = L.p.



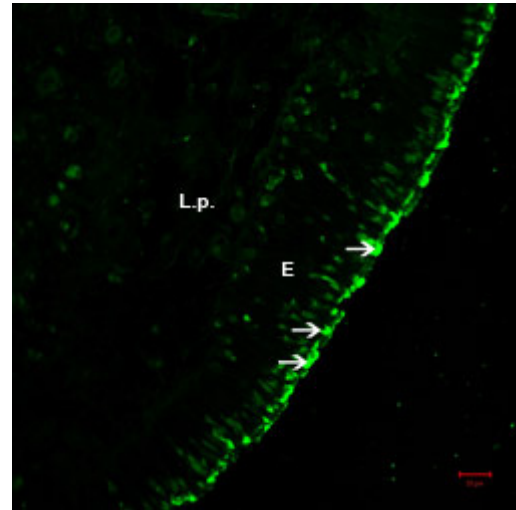
**Abb. 79** PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2, SB = 50µm

Am Tag 2 weist nur die apikale Oberfläche (Pfeil) des Eileiterepithels Bindungsstellen mit PNA auf. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 80** PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4, SB = 20µm

Am Tag 4 reagieren hauptsächlich die Protrusionen (Pfeil) der sekretorischen Zellen des Eileiterepithels stark positiv mit PNA. Epithel = E, Lamina propria = L.p.



**Abb. 81** PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7, SB = 20µm

Am Tag 7 weisen sowohl die Oberflächenstrukturen (Pfeil) der Eileiterepithelzellen, als auch ihr supranukleäres Zytoplasma Bindungsstellen mit PNA auf. Epithel = E, Lamina propria = L.p.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer gut charakterisierten dreidimensionalen Organkultivierungsmethode, bei welcher kleine intakte Gewebefragmente des bovinen Eileiters über einen bestimmten Zeitraum (bis zu 7 Tagen) weitgehend funktionsfähig bleiben. Die kultivierten Gewebefragmente wurden dann histologisch, immunzytochemisch, glykohistochemisch und ultrastrukturell charakterisiert. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei dem Eileiterepithel der Ampulla, um zu sehen, ob diese Kultivierungsmethode eventuell für eine Ko-Kultur mit Embryonen geeignet sein könnte.

Die Untersuchungen wurden an der Ampulla und am Isthmus des Eileiters durchgeführt, wobei der Schwerpunkt auf der Ampulla lag. Das Material wurde von metöstrischen Rindern am Schlachthof München gesammelt. Die Zyklusdiagnose erfolgte über den ovariellen Befund.

Der bovine Eileiter ist ein paariges, keimleitendes Organ, das unmittelbar am Eierstock beginnt, aber nicht im kontinuierlichen Zusammenhang mit ihm steht (Pauerstein und Woodruff, 1967). Der Eileiter besteht aus vier verschiedenen Segmenten, die regionale Unterschiede in ihrer physiologischen Funktion zeigen. Das Infundibulum ist für die ovulierte Eizelle wichtig, in der Ampulla findet die Befruchtung statt, der Isthmus dient als Spermienreservoir und als Ort der Spermienreifung und Kapazitation und die Pars uterina stellt die Verbindung zum Uterus her. Dort findet die Implantation und der überwiegende Teil der Embryonalentwicklung statt (Eddy und Pauerstein, 1980; Leese, 1988).

Das bovine Eileiterepithel ist ein einschichtiges hochprismatisches Epithel, das hauptsächlich aus Zilienzellen und sekretorischen, nichtzilientragenden Zellen besteht (Lombard et al., 1950). Im bovinen Isthmus und in der Ampulla finden sich Zilienzellen und sekretorische Zellen zu etwa gleichen Anteilen. Dabei wechseln sich die beiden Zelltypen im Eileiter ziemlich regelmäßig ab (Lücke, 2005). Im Gegensatz dazu sind bei Mensch und Affe lokale Unterschiede in der Verteilung von Zilienzellen und sekretorischen Zellen zu beobachten (Odor und Augustine, 1995; Lyons et al., 2002). Beim Hund sind Zilien im Isthmusepithel nur vereinzelt ausgebildet (Nilsson, 1969). In Übereinstimmung mit Yaniz et al. (2000) habe ich bei meinen Untersuchungen vermehrt Zilien im apikalen und lateralen Faltenbereich des Eileiters beobachtet, im Gegensatz zu Lücke (2005), die im basalen Faltenbereich fast ausschließlich Zilienzellen beschrieben hat. Die sekretorischen Zellen haben im Vergleich zu den zilientragenden Zellen ein dunkles Zytoplasma, was durch die zahlreichen Polyribosomen bedingt ist

(Bjorkman und Fredricsson, 1961). Die Kerne der zilientragenden Zellen sind relativ groß und rund. Nach Bjorkman und Fredricsson (1961) liegen die Kerne apikal und nach Eriksen et al., (1994) eher zentral im Zytoplasma. Dagegen befinden sich die Kerne der sekretorischen Zellen meist im basalen Drittel der Zelle, sofern sie nicht zyklusabhängig in die apikalen Protrusionen verlagert werden (Björkman und Fredricsson, 1961). Im Isthmus befinden sich die Kerne der sekretorischen Zellen auf etwa gleicher Höhe. Deswegen können in diesem Segment zilientragende und sekretorische Zellen besonders gut differenziert werden. Es entsteht ein Muster, bei dem sich eine sekretorische Zelle neben einer zilientragenden Zelle befindet. Diese Ergebnisse konnten durch die Periodic-Acid-Schiff (PAS) Reaktion, die Alcianblaufärbung, den glykohistochemischen Nachweis für RCA und den immunhistochemischen Nachweis für OGP ermittelt werden. Meine Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Lücke (2005) überein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Höhe des Eileiterepithels im Metöstrus ex vivo mit den Veränderungen der Epithelhöhen nach bestimmten Kultivierungszeiten verglichen. Die Höhe des Epithels von der Basallamina zur apikalen Zellmembran beträgt in der Ampulla am Tag 0 durchschnittlich 30,5  $\mu\text{m}$ , am Tag 2: 31,8  $\mu\text{m}$ , am Tag 4: 33,2  $\mu\text{m}$ , am Tag 7: 32,8  $\mu\text{m}$ . Es hat sich damit während der Kultur nicht signifikant verändert.

Im Isthmus ist das Epithel niedriger als in der Ampulla. Die durchschnittliche Höhe der Epithelzellen beträgt am Tag 0: 28,3  $\mu\text{m}$ , am Tag 2: 25,9  $\mu\text{m}$ , am Tag 4: 29,2  $\mu\text{m}$  und am Tag 7: 29,3  $\mu\text{m}$ . Dies weist gleichfalls auf nur geringe Veränderungen hin. Allerdings muß berücksichtigt werden, dass bei den Messungen in der Kultur relativ große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bestehen.

Bei den sekretorischen Zellen wölbt sich das apikale Zytoplasma zyklusabhängig mehr oder weniger weit ins Eileiterlumen vor. Dabei entstehen die sogenannten Protrusionen (Lombard et al., 1950; Bjorkman und Fredricsson, 1960). Diese Protrusionen können sowohl sekretorische Granula und Zellorganelle als auch Kerne oder Kernreste enthalten (Eriksen et al., 1994). Lücke (2005) wies kernhaltige Protrusionen im Diöstrus und Proöstrus nach. Im Metöstrus beschreibt sie nur Protrusionen, die keine Zellkerne, sondern nur sekretorische Granula enthalten. Bjorkman und Fredricsson (1960) beschreiben kernhaltige Protrusionen während der gesamten lutealen Phase. Das Vorkommen von Zellorganellen in den Protrusionen ist nach Beobachtungen von Lücke (2005) vor allem in den kernhaltigen Protrusionen gegeben.

Nach meinen Untersuchungen sind im Metöstrus sowohl kernhaltige als auch solche mit Sekretgranula und Zellorganellen zu finden. Diese Protrusionen werden auch in Kultur beobachtet und nehmen am Tag 4 zu. Es liegen bisher keine ausreichenden Angaben über die Funktion der Protrusionen vor. Die sekretorischen Zellen nehmen durch ihre sich nach apikal verjüngende Form einen relativ geringen Anteil an der epithelialen Oberfläche ein. Die Funktion der Protrusionen im Metöstrus könnte deswegen zur Vergrößerung der sekretorisch aktiven Oberfläche dienen.

Im Metöstrus passiert der Embryo den Eileiter (Eriksen et al., 1994). Im Metöstrus ist die stärkste sekretorische Aktivität im Eileiterepithel zu verzeichnen, wie auch aus der Ansammlung von zahlreichen hellen und dunklen sekretorischen Granula im apikalen Zytoplasma verdeutlicht wird. Abe und Oikawa (1990) und Odor et al. (1983) unterscheiden zwei verschiedene Arten von sekretorischen Granula: elektronendichte mit homogenem Inhalt und weniger elektronendichte mit lamellärer innerer Struktur. Verhage et al. (1990) beobachten auch sekretorische Granula mit verschiedener Elektronendichte und lamellärer Innenstruktur, sogenannte „Digiprints“. Bei meinen Untersuchungen waren „Digiprints“ am Tag 0 zu beobachten. Sie kommen im apikalen Zytoplasma oder in Kernnähe vor. Manche liegen der apikalen Zellmembran direkt an. Ihr Inhalt ist heteromorph und sie können unterschiedliche Dichte haben. Meistens erscheinen sie wenig elektronendicht, bis auf dunklere Membranen, die ihr Inneres durchziehen. In einigen Bereichen sieht es aus, als würden diese „Digiprints“ mit der Zytoplasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt in das Lumen des Eileiters entlassen. Sie sind mit den sekretorischen Granula mit lamellärer Innenstruktur vergleichbar. Allerdings waren die „Digiprints“ in den folgenden Kulturtagen nicht mehr zu finden. In Übereinstimmung mit Kenngott (2005) liegen die hellen sekretorischen Granula unterhalb der dunklen Granula. Nach ihrer Beobachtung können die hellen sekretorischen Granula als Vorstufen der dunklen Granula angesehen werden. Die sekretorischen Granula nahmen in der Organkultur deutlich ab. Zudem waren auch atypische Granula mit elektronendichter, doppelter Membran zu beobachten, die möglicherweise entspeicherte sekretorische Granula bzw. „Digiprints“ sein könnten. Das ist deshalb wahrscheinlich, weil ihr Auftreten mit dem Verschwinden der typischen sekretorischen Granula korreliert. Ihrem Aussehen nach zu urteilen unterliegen sie degenerativen Prozessen. Eine Verminderung der sekretorischen Granula in den Zellen während der Kultur ist grundsätzlich von großer funktioneller Relevanz und könnte ein Problem bei der Ko-Kultur mit Embryonen darstellen. Die in den Granula der Eileiterepithelzellen enthaltenen Substanzen werden ins Eileiterlumen sezerniert und dürften von Bedeutung für die frühe emb-



ryonale Entwicklung sein. Der frühe Verlust der sekretorischen Aktivität wird auch bei vielen Zellkulturen des Eileiterepithels beschrieben (Joshi, 1988; Joshi, 1995; Walter, 1995; Reischl et al., 1999). Es scheint demnach sehr schwierig zu sein, die sekretorische Funktion der Eileiterepithelzellen in einer Kultur aufrechtzuerhalten. Interessant ist, dass die geringste Zahl an sekretorischer Granula an Tag 4 zu finden ist und ihre Zahl an Tag 7 wieder leicht zunimmt. Ebenfalls eine interessante Beobachtung ist, dass OGP-positive Zellen bis zum Tag 7 vorhanden sind. Die sekretorischen Zellen des Eileiters produzieren und geben Oviduct-spezifische Proteine durch Exozytose in das Eileiterlumen ab (Verhage et al., 1990). Dies trifft auch für die Organkultur des Eileiterepithels zu. OGP-Zellen haben verschiedene Aufgaben (Hunter, 1994). OGPs fördern die Entwicklung des Embryos bei verschiedenen Tierarten Maus (Kapur und Johnson, 1985; Kapur und Johnson, 1986), Goldhamster (Leveille et al., 1987), Schwein (Bui et al., 1989; McCauley et al., 2003), Ziege (Abe et al., 1995a), Rind (Malayer et al., 1988; Boice et al., 1990a; Gerena und Killian, 1990), Affe (Verhage et al., 1989), Mensch (Verhage et al., 1988; Wagh und Lippes, 1989), bzw. modifizieren die Oberfläche von Spermien (Sutton et al., 1984; Abe et al., 1995b; Satoh et al., 1995). Oikawa et al. (1988) und Abe et al. (1998) haben gezeigt, dass beim Goldhamster Ovidukt spezifische Glykoproteine (GHOGP) an die Zona pellucida der ovulierten Eizelle gebunden werden. Einige Autoren vermuten, dass die OGPs die Spermienpenetration (Boatman und Magnoni 1995) oder die Interaktionen zwischen Spermien und Zona pellucida (Kimura et al., 1994) bei der Befruchtung in vitro beeinflussen. Abe et al. (1998) induzierten die Produktion von OGP in neugeborenen Goldhamstern durch Gabe von Östrogen. Sie identifizierten dann OGP in der Golgi-Region und in den sekretorischen Granula der sekretorischen Zellen. Im Gegensatz dazu lokalisierten Verhage et al. (1990) OGP ausschließlich in den Granula der sekretorischen Zellen der Ampulla und des Isthmus. Kapur und Johnson (1988) fanden eine OGP Reaktion nur in der Ampulla des murinen Eileiters, jedoch nicht im Epithel des Isthmus. Bei meinen Untersuchungen war im Isthmus am Tag 0 eine viel schwächere Reaktion für OGP als im Epithel der Ampulla zu verzeichnen. In den folgenden Kulturtagen nahm die Intensität der OGP-Reaktion zum Teil etwas zu und blieb bis zum Ende der Kultivierungszeit (Tag 7) erhalten. Im Gegensatz zu Verhage et al. (1990) und Abe et al. (1998) war bei meinen Untersuchungen eine positive Reaktion für OGP im gesamten Zytoplasma der sekretorischen Zellen des Eileiterepithels einschließlich der Protrusionen zu finden. Lombard et al. (1950) beobachteten Protrusionen im späten Diöstrus, die oft nur über schmale Zytoplasmaverbindungen mit dem Epithel verbunden waren. Er beschreibt weiter, dass die in den Protrusionen enthaltenen Kerne pyknotisch aussehen. Ich konnte dagegen keine Degenerationsmerkmale an den in den Protrusionen

enthaltenen Kernen feststellen. Eriksen et al. (1994) sehen die Protrusionsbildung als einen Vorgang an, der mit der Zellerneuerung in Verbindung steht. Nach meiner Interpretation deuten große Vakuolen, Lysosomen und Autolysosomen, die sich am Tag 4 besonders in den sekretorischen Zellen immer stärker ausbilden, möglicherweise auf eine Zelldegeneration hin. Allerdings sind am Tag 7 weniger Vakuolen und Lysosomen als am Tag 4 zu beobachten. Ob sich die Zellen nach Tag 7 wieder regenerieren, bedarf weiterer Untersuchungen. Michelini et al. (2004) haben in ihrer dreidimensionalen Gewebekultur von humaner Ektozervix eine Regeneration des Plattenepithels ab Tag 10 der Kultur beobachtet. In Übereinstimmung mit Lombard et al. (1950) fand ich am Tag 0 und in den folgenden Tagen in der Kultur frei im Lumen des Eileiters vorkommende Zellen und granuläres Material. Dabei könnte es sich um Protrusionen handeln, deren dünne, zytoplasmatische Verbindung zum unterlagernden Epithel nicht angeschnitten ist. Lücke (2005) hat im späten Diöstrus und im Proöstrus gehäuft freie Vesikel in den basalen Regionen zwischen zwei Falten beobachtet.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zum Vorkommen und zu den zyklischen Veränderungen des Zilienbesatzes im bovinen Eileiter. Während einige Autoren einen Zilienverlust postulieren, nehmen andere eine Veränderung der Anzahl zilientragender Zellen an. Zu entscheiden, welche von beiden Hypothesen richtig ist, ist auch mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen schwierig. Die Nomenklatur ist ebenfalls nicht einheitlich. Während in älterer Literatur von nichtzilientragenden Zellen (Lombard et al., 1950) gesprochen wird, werden diese in der neueren Literatur als sekretorische Zellen bezeichnet (Pauerstein und Woodruff, 1967; Yaniz et al., 2000). Es bleibt aber ungeklärt, ob eine nichtzilientragende Zelle grundsätzlich sekretorische Funktion hat, oder ob es sich um eine zilientragende Zelle mit zeitweiligem Zilienverlust handelt. Weiterhin ist unklar, ob von einem Zilienverlust tatsächlich alle Zilien einer Zelle betroffen sind oder nur einzelne Zilien abgeworfen werden. Weiter wird kontrovers diskutiert, ob es sich bei den Eileiterepithelzellen um zwei verschiedene Zellpopulationen handelt oder ob sich zilientragende Zellen in sekretorische Zellen umwandeln können. Odor und Augustine (1995) finden sekretorische Granula in zilientragenden Zellen. Abe und Oikawa (1993) beschreiben Ziliogenese in sekretorischen Zellen unter Östrogenstimulation. Beide sind der Ansicht, dass diese zwei verschiedenen Zellarten sich ineinander umwandeln können. Im Gegensatz dazu finden Bjorkman und Fredricsson (1961) und auch Lücke (2005) keine Übergangsformen zwischen sekretorischen und zilientragenden Zellen. Ihrer Ansicht nach weisen beide Zellarten sehr große morphologische Unterschiede auf.

Bei der Ratte überwiegen zyklusabhängig entweder die zilientragenden oder die sekretorischen Zellen (Shirley und Reeder, 1996). Die Autoren nahmen eine Umwandlung von sekretorischen in zilientragende Zellen und umgekehrt an (Shirley und Reeder, 1996). Bei meinen Untersuchungen an Organkulturen des bovinen Eileiterepithels habe ich am Tag 2 deutliche Anzeichen für Ziliogenese (supranukleäre Deuterosomen) in einer typischen sekretorischen Zelle beobachtet. Bei der Ziliogenese werden die Zilien von Basalkörperchen ausgehend gebildet, welche ihrerseits auf zwei Wegen gebildet werden, auf dem azentriolären und zentriolären Weg. Beim azentriolären Weg werden die Basalkörperchen ausgehend von kleinen, fibrösen Granula gebildet (Anderson und Brenner, 1971). Sie befinden sich meistens im apikalen Zytoplasma, haben eine unregelmäßige Form und wurden hauptsächlich in Gruppen gefunden. Die fibrösen Granula formieren sich zu runden oder ovalen Körperchen (Deuterosomen). Fibröse Granula wurden von Nayak und Ellington (1977) in Eileiterepithelzellen beim Rind, von Anderson und Brenner (1971) beim Rhesus Affen und von Sorokin (1968) bei der Ratte beobachtet. Die fibrösen Granula formieren sich zu Sphären, welche sich zu größeren Untereinheiten vereinigen. Anschließend werden sie zu hohlen Sphären, zu den Deuterosomen umgebildet (Sorokin, 1968). Die Deuterosomen sind durch keine Membran vom Zytoplasma abgegrenzt und weisen eine ringförmige Struktur auf (Sorokin, 1968; Anderson und Brenner, 1971). Sie dienen als Zentren für das Wachstum und die Organisation der Prozentriolen (Abughrien und Dore, 2000). Jedes Deuterosom wird von zwei bis sechs Prozentriolen umgeben. Diese entwickeln sich zu „Basalkörperchen“ und wandern an die Oberfläche der Zelle. Für eine Ziliogenese ist typisch, dass außer Prozentriolen in verschiedenen Entwicklungsstadien auch Deuterosomen und viele fibröse Granula in der subnukleären Region vorkommen (Abughrien und Dore, 2000). Dem zentriolären Bildungsweg von Basalkörperchen und Zilien gehen diplosomale Zentriolen voraus, in deren Nachbarschaft dann die Prozentriolen entstehen. Hagiwara et al. (1992) beschreiben die Bildung von Zilien auf dem zentriolären Weg bei der Ratte, wobei der Hauptanteil der Basalkörperchen durch eine sich wiederholende Eigenreplikation der Zentriolen gebildet wird. Abughrien und Dore (2000) haben beim Rind deutliche Anzeichen für Ziliogenese zwischen Tag 1 und Tag 3 des Zyklus beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen im Eileiter während der folliculären Phase beim Menschen (Verhage et al., 1979; Hagiwara et al., 1992) und beim Rhesus Affen (Anderson und Brenner, 1971). Verschiedene Autoren konnten nachweisen, dass die Ziliogenese durch Östrogene stimuliert wird (Brenner, 1969; Anderson und Brenner, 1971; Verhage et al., 1990). Im Gegensatz dazu konnte Lücke (2005) keine Anzeichen für eine Ziliogenese in der folliculären Phase finden.

Die so genannten „peg cells“ oder Stiftchenzellen werden in verschiedenen Arbeiten über den Eileiter erwähnt (McDaniel et al., 1968; Verhage et al., 1973; Hees und Sinowatz, 1992). Was genau sie für eine Rolle spielen ist nicht klar. Bei meinen Untersuchungen waren sie nicht nur am Tag 0 sondern auch in den nachfolgenden Kulturtagen im Eileiterepithel zu beobachten. Die Stiftchenzellen ähneln in ihrer Form und Färbung den sekretorischen Zellen, zumindest wenn diese keine Protrusionen vorweisen. Im Gegensatz zu McDaniel et al. (1968) und Lücke (2005), bei denen die Stiftchenzellen keine Zilien aufwiesen, konnte ich in meinen Untersuchungen auch Stiftchenzellen mit Zilienbesatz beobachten. Außerdem war zu sehen, dass sich Stiftchenzellen aus dem Zellverband lösen. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung von Hees und Sinowatz (1992), dass es sich bei den Stiftchenzellen um untergehende Epithelzellen handelt. Verhage et al. (1973a) sind dagegen der Meinung, dass es sich bei ihnen um eine Übergangsform zwischen zilientragenden und sekretorischen Zellen handelt.

Im basalen Bereich des Epithels sind Zellen zu lokalisieren, die der Beschreibung von Lombard (1950) von „Basalzellen“ entsprechen. Meine Untersuchungen zeigen Basalzellen im basalen Zytoplasma des Eileiterepithels und zum Teil im Bindegewebe nicht nur am Tag 0, sondern auch während der gesamten Kulturperiode. Sie kommen in unregelmäßigen Abständen und Anzahl vor. Pro 100 Epithelzellen sind circa zwei bis vier Basalzellen zu finden. Übereinstimmend mit den Befunden von Bjorkman und Fredricsson (1961) besitzen diese Zellen einen relativ großen Zellkern, der von wenig, hellem Zytoplasma umgeben ist. Die Zellen besitzen relativ wenig Zellorganelle und sind nicht an der Basalmembran verankert. Laut Lücke (2005) geben sie mit den Antikörpern gegen Panzytokeratin und S100 keine positive Immunreaktion. Deshalb kann ein epithelialer Ursprung ausgeschlossen werden (Walter und Miller, 1996). Die „Basalzelle“ ist demnach als mobile Zelle anzusehen. Die Identifikation dieser Zellen als Leukozyten (Abughrien und Dore 2000) scheint plausibel. Es handelt sich bei den basalen Zellen vorwiegend um Lymphozyten, daneben wurden auch einige intraepitheliale Makrophagen identifiziert (Abughrien und Dore, 2000).

In allen Abschnitten des bovinen Eileiters sind Primärfalten (*Plicae tubariae*) zu beobachten. Die Faltenstruktur variiert in den verschiedenen Segmenten des bovinen Eileiters. Die Länge der Falten und ihre sekundäre Aufgliederung nimmt in Richtung des Infundibulums zu (Hees und Sinowatz, 1992), während ihre Breite in Richtung des Isthmus zunehmend ist (Schmidt-

Barth, 1981). Lombard et al. (1950) beschreiben in der Ampulla bis zu 20 Primär- mit bis zu 8 Sekundärfalten, während im Isthmus nur 4-6 Primärfalten vorkommen. Das Infundibulum hat die komplizierteste Faltenarchitektur. Hier kommen zusätzlich Tertiärfalten vor. Am freien Rand des Trichters sind die Falten am größten und haben basal eine starke Tendenz zur Verzweigung (Lombard et al., 1950). Yaniz et al. (2000) lieferten eine sehr genaue Beschreibung der komplizierten, dreidimensionalen Struktur der Falten. Nach seinen Angaben kommen in der Ampulla circa 6-10 Falten vor. Zwischen zwei dieser langen Falten liegen eine bis drei kurze Falten. Die Anzahl der Falten nimmt nach kaudal ab, so dass im Isthmus nur noch eine Anzahl von 4-6 flachen, dicken Falten zu finden ist. Weiterhin fanden Yaniz et al. (2000) eine Höhlen- und Taschenbildung in den Falten mit Öffnungen, die in unterschiedliche Richtungen weisen. Im Infundibulum und der Ampulla zeigen sie ovarwärts, während sie im Isthmus und der Pars uteri in Richtung Uterus weisen. Diese Taschen werden durch sekundäre Falten in basalen Bereichen der Primärfalten gebildet, die untereinander verbunden sind. Die so entstehenden kleinen Höhlen sind im Isthmus flacher als in der Ampulla. An ihrem Grund befinden sich zusätzlich Krypten, die als morphologische Barriere für die Spermien gedeutet werden (Yaniz et al., 2000). Die Taschen bildenden Falten sind in Richtung der uterotubalen Verbindung (UTJ) eher schräg und in Richtung der Ampulla vermehrt transversal gerichtet (Yaniz et al., 2000). Unter Kulturbedingungen verändert sich die ganze Faltenstruktur der Eileiterfragmente. Es sind nur Primärfalten zu beobachten. Zusätzlich sind sie viel niedriger als unter in vivo Bedingungen und es kommen viele fächerförmige Falten vor. Die Faltenstruktur in der Ampulla ist ähnlich wie die Faltenstruktur im Isthmus unter in vivo Bedingungen. Das Bindegewebe verändert sich unter Kulturbedingungen stark. Das Bindegewebe ist zellarm und wenig kompakt. Die Blutgefäße im Bindegewebe bleiben bis zum Ende der Kultur gut erhalten.

Unter den angewandten Kultivierungsbedingungen scheint das Epithel intakt zu bleiben. Ein Teil der Epithelzellen weist degenerative Veränderungen auf, wobei sie zum Teil auch ihre Form verändern. Ein Teil der Zellen wird runder und flacher, so dass das Kern-Plasma-Verhältnis abnimmt. Ein anderer Teil der Zellen nimmt durch Vakuolenbildung extreme Größen an. Das erklärt, warum bei den morphometrischen Auswertungen der Zellen keine klare Tendenz zu erkennen war. Die äußere Gestalt der Kulturzellen variiert relativ stark. Ob diese degenerativen Erscheinungen mit einem Funktionsverlust einhergehen, bedarf weiterer Untersuchungen. Micheline et al. (2004) beschreiben bei ihrer Gewebekultur des humanen Ektozervix eine rapide Verschlechterung der Zellmorphologie in Kultur am Tag 4. Die Epithelhöhe

nimmt ab. Weiter sind Vakuolen aufzufinden und die oberen Schichten des Plattenepithels lösen sich aus dem Zellverband ab. Nur noch wenige Zellen der basalen und parabasalen Schichten bleiben mit dem darunter liegenden Bindegewebe in Verbindung. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit meinen Befunden überein. Es kommen auch im Eileiterepithel grosse Vakuolen, Lysosomen und Autolysosomen innerhalb der Eileiterepithelzellen vor. Die sekretorischen Granula sind zum größten Teil verschwunden. Die Oberfläche der Eileiterepithelzellen erscheint unregelmäßig und die apikalen Zellkuppen der sekretorischen Zellen und der Zilienzellen stülpen sich unterschiedlich geformt vor. Andererseits ist bei meinen Untersuchungen eine durchgehende, ebene Basalmembran elektronenmikroskopisch und zytochemisch über den gesamten Kulturzeitraum zu beobachten. Es erscheint möglich, dass das unterlagernde Bindegewebe für die Polarität und die Erhaltung der Funktionen des Epithels von entscheidender Bedeutung ist. Michelini et al. (2004) sind der Meinung, dass sich das Epithel ab dem zehnten Tag von der basalen und parabasalen Epithelschicht aus wieder regeneriert. Bei meinen Untersuchungen scheint es in den Eileiterproben am Tag 7 weniger Vakuolen und Lysosomen zu geben. Auffallend ist, dass die basalen Anteile der Zellen organellenärmer geworden sind. In Übereinstimmung mit Michelini et al. (2004) waren auch in meiner Kultur relativ viele Zellen in das Zellulose-schwämmchen ausgewandert. In diesen Proben sind auch Mitosen zu beobachten. Michelini et al. (2004) vertreten außerdem die Meinung, dass sich die Epithelschichten regenerieren, indem sie Prozesse, die bei der Wundheilung beobachtet werden, imitieren.

Die zellulären Charakteristika der Eileitergewebekultur wurden mittels Transmissions-elektronenmikroskopie detailliert untersucht. Die Ergebnisse müssen differenziert betrachtet werden. Auf der einen Seite sind im basalen Bereich des Epithels ab Tag 4 der Zellen starke morphologische Veränderungen festzustellen, wie z.B. intrazelluläre Vakuolen, Lysosomen und Autolysosomen. Andererseits war unter den gewählten Kulturbedingungen zu keinem Zeitpunkt eine interzelluläre Spaltbildung oder Vergrößerung des Interzellularraums zwischen benachbarten Zellen zu beobachten. Dies wurde bei adhärenenten Eileiterepithelzellen (Reischl et al., 1999) oder bei Suspensionskultur von Eileiterepithel (Lücke, 2005) als degenerative Erscheinung beschrieben. Auch blieb bei meinen Organkulturen Zilienbesatz und Organellenreichtum im apikalen Zytoplasma während der ganzen Kulturperiode relativ gut erhalten. In adhärenenten Epithelzellkulturen hingegen geht der Zilienbesatz schnell vollständig verloren (Takeuchi et al., 1991; Kervancioglu et al., 1994). Eine normale Ausstattung mit Zellorganellen wird jedoch in der Literatur teilweise auch bei adhärenenten Zellkulturen beschrieben

(Takeuchi et al., 1991; Walter 1995; Rief et al., 2002). Bei Verwendung von TCM 199 Medium fanden Rief et al. (2002) einen relativ hohen Organellengehalt der Zellen. In anderen Untersuchungen mit Zellkulturen wurde dagegen eine Verminderung der Zellorganellen beobachtet. Gomez und Uria (1997) finden neben reichlich granuliertem endoplasmatischen Retikulum nur wenige Zellorganellen und keinen Golgi-Apparat. Die in den Zellen vorkommenden Glykogeneinlagerungen wurden auch von anderen Autoren im Zytoplasma von kultivierten Eileiterepithelzellen gefunden (Takeuchi et al. 1991; Walter 1995; Reischl et al. 1999; Lücke 2005). Von den Autoren wurden auch Lipidvakuolen beobachtet, die auf die Kulturbedingungen zurückgeführt werden. Reichhaltige Medien durften zu stärkeren Glykogen- und Lipideinlagerungen als andere Medien (Rief, 2001) führen.

Der immunhistochemische (IHC) Nachweis des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) fällt bei meinen Untersuchungen in den Zellkernen der Ampulla stärker positiv aus als im Isthmus. Im Isthmus befinden sich die stark positiven Zellkerne hauptsächlich in den Falten des Eileiterepithels. Das Bindegewebe im Isthmus zeigt eine deutlich positive (++) Reaktion. In Gegensatz dazu fällt die Reaktion in der Ampulla schwach (+) bis deutlich (++) positiv aus. Vermeirsch et al. (2002) finden beim Hund die stärkste Färbeintensität beim immunhistochemischen Nachweis von ER $\alpha$  und PR in den Fibrozyten der Lamina propria. Die Zellkerne der Eileitermuskulatur zeigen bei meinen Untersuchungen eine stark (+++) positive Reaktion für ER $\alpha$ . Die Reaktionsstärke der Kerne der zilientragenden Zellen ist dabei deutlich schwächer als die der sekretorischen Zellen. Auch bei Primaten ist der ER $\alpha$  vorwiegend in den sekretorischen Zellen lokalisiert (Brenner et al., 1990). Beim Schwein weisen die zilientragenden Zellen keine Reaktion mit dem Antikörper gegen den ER $\alpha$  auf (Steffl et al., 2004). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lücke (2005) ist die Expression des Progesteronrezeptors (PR) im Metöstrus im Isthmus stärker als in der Ampulla. Diese Beobachtungen stimmen auch mit den Befunden von Ulbrich et al. (2003) überein, wonach die stärkste Immunreaktion in der frühen lutealen Phase vorhanden ist. Ulbrich et al. (2003) stellen mittels PCR einen starken Abfall der PR mRNA-Expression in der Ampulla in der frühen lutealen Phase fest. Im Isthmus ist die Expression des PR in der lutealen Phase nicht so stark vermindert.

In den Proben meiner Organkultur fällt die immunhistochemische Reaktion auf ER $\alpha$  nur im Epithel positiv aus. Im Gegensatz dazu ist die immunhistochemische Färbung für PR im Bindegewebe bis zum Ende der Kultur deutlich (++) bis stark (+++) positiv geblieben. Die Intensität der Immunfärbung variierte bei meinen Versuchen zwischen den einzelnen Präparaten deutlich. Während bei einigen Zellverbänden die Kerne aller Zellen ER $\alpha$  bzw. PR positiv wa-



ren, verhielten sich andere gänzlich negativ. Die Präparate aus dem Isthmus wiesen einen höheren Anteil rezeptorpositiver Zellen auf als die Präparate aus der Ampulla. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lücke (2005) überein. Die Reaktion auf beide Rezeptoren (ER $\alpha$  und PR) fällt aber allgemein schwächer aus als bei ex vivo Präparaten. Bei beiden Hormonrezeptoren (ER $\alpha$  und PR) war eine deutliche (++) bis starke (+++) Reaktion in den Zellkernen der Eileiterepithelzellen bis zum Tag 7 der Kultur zu beobachten. Im Gegensatz dazu fanden Michelinini et al. (2004) in ihren Organkulturen eine stark positive Reaktion für ER $\alpha$  nur bis zum Tag 4. Ab diesem Zeitpunkt fiel sie negativ aus. Lücke (2005) konnte für beide Rezeptoren bei ihren Sphäroidkulturen nur eine geringe Expression nachweisen. Im Gegensatz dazu beschreiben Comer et al. (1998) auch bei adhärennten Zellkulturen eine deutlich positive Immunfärbung mit den Antikörpern gegen ER $\alpha$  und PR. Das Kulturmedium, das ich bei meinen Untersuchungen verwendete, enthielt keinen Hormonzusatz. Comer et al. (1998) zeigten, dass eine Supplementierung des Nährmediums mit Östrogen keinen Einfluß auf die Expression der Hormonrezeptoren ER $\alpha$  und PR hat.

Hansen (1998) berichtet über eine immunregulierende Wirkung von Progesteron im Uterus. Progesteron stimuliert die Sekretion von „Uterine Milk Protein“ (UTMP) im Uterus. UTMP hat eine hemmende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation. Es wird von Uterindrüsen und vom Oberflächenepithel des Uterus produziert und in die Uterinflüssigkeit abgegeben (Leslie und Hansen, 1991). Dieses Protein gehört zur Serpin-Familie der Proteasehemmer. Während der Trächtigkeit ist UTMP das dominierende Protein in der Uterinflüssigkeit. Eine längere Progesteronstimulierung erhöht die UTMP Sekretion (Leslie und Hansen, 1991). Bis jetzt wurde in der Literatur die Expression der UTMP-Rezeptoren nur im Uterusepithel und in den Uterindrüsen beschrieben. Bei meinen Untersuchungen am bovinen Eileiter zeigt sich eine deutliche Expression der UTMP-Rezeptoren im Eileiterepithel und zwar nicht nur in Metöstrus, sondern auch während der gesamten Kulturperiode.

Der glykohistochemische Nachweis von Kohlenhydraten im bovinen Eileiter wurde mit FITC-konjugierten Lektinen durchgeführt. Während die PAS-Reaktion und die Färbung mit Alcianblau nur einen relativ unspezifischen Nachweis von Kohlenhydraten liefern, sind Lektine aufgrund ihrer selektiven Bindung an bestimmte Zucker geeignete Hilfsmittel zur histologischen Lokalisation und Identifizierung von Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen und in der Zelle (Gabius et al., 1988). Die zur Untersuchung verwendeten 8 Lektine (Con A, PSA, PNA, RCA, DBA, WGA, WGAs, UEA) zeigen im Eileiter des Rindes ein charakteristisches

Bindungsmuster. Soderstrom et al. (1984) konnten zeigen, dass die Fixierung des Gewebes die Bindungsaktivität der Lektine beeinflusst. Sie fanden bei ihren Untersuchungen, dass die Bindung der Lektine PNA, WGA, Con A, RCA, SBA, DBA und UEA in Bouin fixiertem Gewebe deutlich höher gegenüber Formalin fixiertem Gewebe ist. Auch mit einem bestimmten Fixierungsmittel können mehrere Lektine ein unterschiedliches Bindungsmuster zeigen (Malmi und Soderstrom 1988). Während PNA gut mit Formalin fixiertem Gewebe reagiert, zeigen andere Lektine (SBA, DBA und UEA) bei einer Formalinfixierung eine abnehmende Bindungsintensität, beziehungsweise binden nicht mehr (Con A, WGA, WGs und RCA). Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Proben für die glykohistochemischen Untersuchungen in Bouin'scher Lösung fixiert. Mit den aufgeführten Lektinen konnte ich im Eileiter des Rindes folgende Zucker nachweisen: Mannose, Fukose, D-Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin. Con A ist ein D-Mannose/D-Glukose-bindendes Lektin. In meinen Untersuchungen hat Con A im Eileiterepithel sowohl mit den sekretorischen Zellen als auch mit den Zilienzellen reagiert. Bei Walter und Bavdek (1997) reagierte Con A in der lutealen Phase stärker mit den sekretorischen Zellen als mit den Zilienzellen. PSA bindet spezifisch an Mannose und gehört derselben Gruppe an wie Con A. Beide Lektine führen in meinen Untersuchungen zu einer Anfärbung des apikalen Epithelsaumes des Eileiters. WGA gehört zu den N-Acetyl-D-Glukosamin-bindenden Lektinen. Es zeigt in meinen Untersuchungen am apikalen Epithelsaum des Eileiterepithels und auch im paranukleären Zellbereich eine starke Fluoreszenz, im basalen Zytoplasmabereich dagegen war die Bindung schwach. Walter und Bavdek (1997) fanden auch eine deutliche Reaktion in der apikalen Glykokalix von den sekretorischen Zellen und den Zilienzellen. Im Isthmus war die Reaktion stärker als in der Ampulla. In der Golgi Region und in den sekretorischen Granula der sekretorischen Zellen ist die Reaktion auch deutlich, was für einen hohen Anteil an N-Acetyl-D-Glucosamin-Resten spricht. Bei den Untersuchungen von Leitner et al. (2003) band WGA auch in der Golgi-Region und an der apikalen Oberfläche der Epithelzellen und zwar nur im Metöstrus. Bei der Reaktion mit WGs sind vereinzelt stark positive Granula im supranukleären Zellbereich zu beobachten. UEA, das zu den L-Fukose-bindenden Lektinen gehört, zeigt in meinen Untersuchungen im bovinen Eileiterepithel eine deutliche Reaktion in den Protrusionen der sekretorischen Zellen und mit den Mikrovilli, besonders bei den Zilienzellen. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von Walter und Bavdek (1997) überein. Bei Leitner et al. (2003) waren auch die meisten Bindungsstellen für UEA an der apikalen Oberfläche der Epithelzellen zu finden. Eine schwächere Reaktion war bei mir im supranukleären Zellbereich zu sehen. Es kommen auch vereinzelt Zellen vor, die im gesamten Zytoplasma eine schwach positive Färbung auf-

weisen. Nach Walter und Bavdek (1997) bindet UEA während der lutealen Phase an den sekretorischen Granula im Isthmus, aber nicht in der Ampulla oder im Infundibulum. In Übereinstimmung mit Walter und Bavdek (1997) bindet RCA bei meinen Untersuchungen hauptsächlich an der apikalen Glykokalix. Supranukleär befinden sich zahlreiche fluoreszierende Granula. Die Oberflächenstrukturen, Zilien und Mikrovilli des Eileiterepithels zeigen eine starke Reaktion auch mit PNA. Außerdem reagieren die in das Kollagen-schwämmchen ausgewanderten Zellen mit PNA sehr intensiv. Das übrige Zytoplasma der Epithelzellen bleibt negativ. Der apikale Epithelbereich des bovinen Eileiters weist Bindungsstellen für DBA auf. Zudem liegen um den Kern deutlich positive Granula und die Protrusionen der sekretorischen Zellen sind stark positiv. Lektin-positive intraepitheliale Immunzellen (Lymphozyten), wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben wurden (Goyal, 1985; Sinowatz et al., 1985), konnten in der vorliegenden Arbeit auch regelmäßig nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die degenerativen Veränderungen der Eileiterzellen während der Kultur relativ gering sind und die Dedifferenzierung der Eileiterepithelzellen im Vergleich zu anderen Zellkulturmethoden schwach ausfällt. Bis Tag 2 sind alle morphologischen Charakteristika von differenzierten Eileiterepithelzellen (verglichen mit dem Ausgangsmaterial) gut erhalten. Am Tag 4 wird eine Degeneration der Zellen deutlich erkennbar. Am Tag 7 sind weniger Degenerationsmerkmale erkennbar. Es ist denkbar, dass weiterführend die Degenerations- und Regenerationsvorgänge (Apoptose und Mitose) im bovinen Eileiterepithel damit untersucht werden könnten.

Als Nachteile einer dreidimensionalen Organkultur, wie auch schon von Hoffman (1991) erwähnt, ist die Heterogenität der Zellen im Vergleich zu permanenten Zelllinien. Auch die Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen ist schwieriger im Vergleich zu Monolayerkulturen.

Da aber die dreidimensionale Gewebekultur und die sekretorische Eigenschaften der Zellen gut erhalten bleiben, ist es vorstellbar, dass eine mehrtägige Eileiterorgankultur zur Erforschung der embryomaternalen Kommunikation von Wert sein könnte.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich des bovinen Eileiterepithels im Metöstrus mit kultiviertem Eileitergewebe (Organkultur) aus der gleichen Zyklusphase. Zu diesem Zweck wurden mittels licht- und elektronenmikroskopischer Methoden sowie mit immun- und glykohistochemischen Techniken die Eileiter von 6 Rindern aus dem Metöstrus untersucht. Hierbei wurden zunächst der anatomische sowie histologische Aufbau des Eileiterepithels (Ampulla und Isthmus) im Metöstrus ex vivo (Tag 0) analysiert und mit dem nach unterschiedlichen Kulturzeiten (Tag 2, Tag 4, Tag 7) verglichen. Im Epithel der Ampulla wurde sowohl am Tag 0 als auch in der Kultur Protrusionen mit unterschiedlichem Inhalt beobachtet. Das Epithel der Ampulla wies im Vergleich zum Isthmus während der Kultur stärkere Veränderungen auf. In der Kultur nimmt im Bindegewebe die Zahl der Zellen und Bindegewebsfasern deutlich ab. Die Höhe des Epithels ist in der Ampulla bei Entnahme am Tag 0 deutlich höher als im Isthmus. Dies bleibt auch in der Kultur erhalten. In den sekretorischen Zellen des bovinen Eileiterepithels am Tag 0 wurden zahlreiche sekretorische Granula unter der apikalen Zytoplasmamembran beobachtet. In der Kultur scheinen die Eileiterepithelzellen relativ langemorphologisch intakt zu bleiben. Die Zilienzellen besitzen zahlreiche Zilien und alle Zellen bleiben bis Kulturende auf der Basalmembran verankert. Die sekretorische Aktivität der kultivierten Epithelzellen nimmt während der Kultur ab. Die Anzahl an Rezeptoren für Östrogen und Progesteron nimmt gleichfalls ab.

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die Organkultur des bovinen Eileiters in den ersten Kulturtagen für eine Ko-Kultur mit Embryonen zur Erforschung der embryo-maternalen Kommunikation gut geeignet zu sein, da das Eileiterepithel während dieser Zeit nur geringe Anzeichen einer Dedifferenzierung aufweist und die physiologische Aufenthaltszeit des bovinen Embryos im Eileiter nur circa drei Tage beträgt.

## 7 Summary

The aim of our study was the establishment and morphological characterization of a three-dimensional organ of the bovine oviduct (ampulla and isthmus). Oviductal fragments (2-3 mm<sup>3</sup>) from 6 cows in metoestrous were cultured on synthetic sponges submerged in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum for up to 7 days and the viability and cellular responses were assayed. The fragments were then analyzed by well established light- and electron-microscopical techniques. Additionally, immunohistochemistry was used to study the localization and distribution of an estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, uterine milk protein and oviductal glycoprotein. Glycohistochemical studies have demonstrated binding sites for *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA), *Ricinus communis* Agglutinin (RCA), *Pisum sativum* Agglutinin (PSA), *Triricum vulgare* Agglutinin (WGA), *Wheat germ* Agglutinin succinyliert (WGAs), *Canavalia ensiforme* Agglutinin (ConA), *Dolichus biflorus* Agglutinin (DBA) and *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA).

The results of my study clearly demonstrated that the epithelium of the fragments preserved their tissue architecture and cellular differentiation up to day 2 of culture comparable to that observed in oviductal tissue in vivo. The epithelial cells of the ampulla showed, compared to the isthmus, stronger modifications, if the culture period was extended. Compared to the ex vivo-specimens, the number of connective tissue cells and fibers appeared reduced. Also the number of secretory granules decreased considerably up to day 4 of culture and then remained stable or even showed a slight increase until day 7 of culture. The oviductal epithelium remained mostly morphological intact. The ciliated cells possessed a large number of cilia. In the ampullary epithelium protrusions with content of different electron density was observed. Using immunohistochemistry, it could be clearly shown that the number of receptors for estrogen and progesterone decreased during cultivation. These results could be interpreted as sign for loss of differentiation at the subcellular level.

In conclusion, organ culture of the bovine oviduct shows many features of the organ in vivo and could be a valuable model for the study of embryo-maternal communication in vitro.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Literaturverzeichnis

- Abe H., Hoshi H. (1997) Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* **23**.
- Abe H., Numazawa C., Abe M., Onodera M., Katsumi A. (1993a) Immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the oviductal epithelium from cows at follicular and luteal phases. *Cell Tissue Res* **274**, 41-7.
- Abe H., Oikawa T. (1990) Study of the differentiation of secretory cells in the golden hamster oviductal epithelium by use of a monoclonal antibody. *J Exp Zool* **254**, 97-106.
- Abe H., Oikawa T. (1993) Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat Rec* **235**, 390-8.
- Abe H., Onodera M., Sugawara S. (1993b) Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the oestrus cycle. *J Anat* **183 (Pt 2)**, 415-21.
- Abe H., Onodera M., Sugawara S. (1995a) Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *J Exp Zool* **272**, 134-41.
- Abe H., Ookata K., Abe M., Oikawa T. (1992) Immunological characterization of oviductal glycoproteins associated with the zona pellucida of the golden hamster egg. *J Exp Zool* **262**, 209-18.
- Abe H., Satoh T., Hoshi H. (1998) Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *J Reprod Fertil* **112**, 157-63.
- Abe H., Sendai Y., Satoh T., Hoshi H. (1995b) Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* **42**, 226-32.
- Abughrien B. M., Dore M. A. (2000) Ciliogenesis in the uterine tube of control and superovulated heifers. *Cells Tissues Organs* **166**, 338-48.
- Abughrien B. M., Dore M. A., McGeady T. A., Fitzpatrick E. (2000) Intraepithelial leucocytes in the bovine uterine tube. *Cells Tissues Organs* **166**, 20-30.

- Anderson R. G., Brenner R. M. (1971) The formation of basal bodies (centrioles) in the rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* **50**, 10-34.
- Ando H., Kobayashi M., Toda S., Kikkawa F., Masahashi T., Mizutani S. (2000) Establishment of a ciliated epithelial cell line from human fallopian tube. *Hum Reprod* **15**, 1597-603.
- Bage R., Masironi B., Sahlin L., Rodriguez-Martinez H. (2002) Deviant peri-oestral hormone patterns affect the epithelium of the uterine tube in repeat-breeder heifers. *Reprod Fertil Dev* **14**, 461-9.
- Bauer M. A., Gorell T. A. (1980) Analysis of progesterone receptor binding in the ovine uterus. *Steroids* **36**, 581-91.
- Bjorkman N., Fredricsson B. (1960) The ultrastructural organization and the alkaline phosphatase activity of the epithelial surface of the bovine fallopian tube. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **51**, 589-96.
- Bjorkman N., Fredricsson B. (1961) The bovine oviduct epithelium and its secretory process as studied with the electron microscope and histochemical tests. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **55**, 500-13.
- Blandau R. J. (1969) Gamete transport-comparative aspects. In: Hafez E.S.E. and Blandau R.J. (Eds.): The mammalian oviduct. Comparative Biology and Methodology. Chicago, University Press.
- Boatman D. E., Magnoni G. E. (1995) Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol Reprod* **52**, 199-207.
- Boice M. L., Geisert R. D., Blair R. M., Verhage H. G. (1990a) Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* **43**, 457-65.
- Boice M. L., McCarthy T. J., Mavrogianis P. A., Fazlebas A. T., Verhage H. G. (1990b) Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biol Reprod* **43**, 340-6.
- Brenner R. M. (1969) Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Fertil Steril* **20**, 599-611.
- Brenner R. M., West N. B., McClellan M. C. (1990) Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* **42**, 11-9.
- Briton-Jones C., Lok I. H., Cheung C. K., Chiu T. T., Cheung L. P., Haines C. (2004) Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells in vitro. *Fertil Steril* **81 Suppl 1**, 749-56.



- Buhi W. C. (2002) Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* **123**, 355-62.
- Buhi W. C., Vallet J. L., Bazer F. W. (1989) De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *J Exp Zool* **252**, 79-88.
- Bullon F., Merchan J. A., Gonzalez-Gomez F., Furio V., Poblete E. G. (1980) Ultrastructure of the oviductal mucosa of the rat. III. Basal and peg cells. *Int J Fertil* **25**, 293-7.
- Carrel A. (1912) On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med* **15**, 516-528
- Casida L. E., Warwick E. J. (1945) The necessity of the corpus luteum for maintenance of pregnancy in the ewe. *J Anim Sci* **4**, 34-36.
- Chen S. S., Revoltella R. P., Papini S., Michelini M., Fitzgerald W., Zimmerberg J., Margolis L. (2003) Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. *Stem Cells* **21**, 281-95.
- Chishima T., Yang M., *et al.* (1997) Governing step of metastasis visualized in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11573-6.
- Comer M. T., Leese H. J., Southgate J. (1998) Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* **13**, 3114-20.
- Couse J. F., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J. A., Korach K. S. (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* **138**, 4613-21.
- DeMott R. P., Lefebvre R., Suarez S. S. (1995) Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* **52**, 1395-403.
- Dickens C. J., Maguiness S. D., Comer M. T., Palmer A., Rutherford A. J., Leese H. J. (1995) Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum Reprod* **10**, 505-8.
- Dirksen E. R. (1971) Centriole morphogenesis in developing ciliated epithelium of the mouse oviduct. *J Cell Biol* **51**, 286-302.
- Donnez J., Casanas-Roux F., Caprasse J., Ferin J., Thomas K. (1985) Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* **43**, 554-9.

- Eddy C. A., Pauerstein C. J. (1980) Anatomy and physiology of the fallopian tube. *Clin Obstet Gynecol* **23**, 1177-93.
- El-Banna A. A., Hafez E. S. (1970) Egg transport in beef cattle. *J Anim Sci* **30**, 430-2.
- Ellington J. E. (1991) The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* **81**, 313-28.
- Eriksen T., Terkelsen O., Hyttel P., Greve T. (1994) Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. *Anat Embryol (Berl)* **190**, 583-90.
- Fell H. B., Robison R. (1929) The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem J* **23**, 767-784 5.
- Fredricsson B. (1959) Proliferation of rabbit oviduct epithelium after estrogenic stimulation, with reference to the relationship between ciliated and secretory cells. *Acta Morphol Neerl Scand* **2**, 193-202.
- Gagne D., Homo F., Duval D. (1980) Steroid-induced inhibition of nucleoside uptake in isolated mouse thymocytes. *Biochim Biophys Acta* **603**, 27-35.
- Gandolfi F., Brevini T. A., Richardson L., Brown C. R., Moor R. M. (1989) Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* **106**, 303-12.
- Geneser F. (1990) Histologie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Gerena R. L., Killian G. J. (1990) Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool* **256**, 113-20.
- Gomez E., Uria H. (1997) Morphological and functional characterization of bovine oviductal epithelial cell monolayers cultured on polarizing membranes. *Reprod Nutr Dev* **37**, 151-62.
- Goyal H. O. (1985) Morphology of the bovine epididymis. *Am J Anat* **172**, 155-72.
- Hagiwara H., Shibasaki S., Ohwada N. (1992) Ciliogenesis in the human oviduct epithelium during the normal menstrual cycle. *J Electron Microsc (Tokyo)* **41**, 321-9.
- Hansen P. J. (1998) Regulation of uterine immune function by progesterone-lessons from the sheep. *J Reprod Immunol* **40**, 63-79.
- Hansen P. J., Bazer F. W., Segerson E. C., Jr. (1986) Skin graft survival in the uterine lumen of ewes treated with progesterone. *Am J Reprod Immunol Microbiol* **12**, 48-54.
- Hees H., Sinowatz F. (1992) Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzteverlag, Köln.

- 
- Hoffman R. M. (1991) Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. *Cancer Cells* **3**, 86-92.
- Hollis D. E., Frith P. A., Vaughan J. D., Chapman R. E., Nancarrow C. D. (1984) Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of Merino ewes during the estrous cycle. *Am J Anat* **171**, 441-56.
- Hunter R. H. (1981) Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* **63**, 109-17.
- Hunter R. H. (1988) The fallopian tube: Their role in fertility and infertility. Springer Verlag, Berlin.
- Hunter R. H. (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **39**, 176-81.
- Hunter R. H. (1998) Have the fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta Obstet Gynecol Scand* **77**, 475-86.
- Hunter R. H. (2005) The fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* **45**, 281-90.
- Hunter R. H., Nichol R. (1983) Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* **228**, 121-8.
- Joshi M. S. (1988) Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *J Reprod Fertil* **83**, 249-61.
- Joshi M. S. (1995) Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *Microsc Res Tech* **31**, 507-18.
- Jost A., Vigier B., Prepin J., Perchellet J. P. (1973) Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* **29**, 1-41.
- Kapur R. P., Johnson L. V. (1985) An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev Biol* **112**, 89-93.
- Kapur R. P., Johnson L. V. (1986) Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J Exp Zool* **238**, 249-60.
- Kapur R. P., Johnson L. V. (1988) Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec* **221**, 720-9.

- Kenngott R. (2005) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur prä- und postnatalen Entwicklung des Eileiters beim Rind. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Kervancioglu M. E., Saridogan E., Martin J. E., Maguiness S. D., Djahanbakhch O. (1994) A simple technique for the long-term non-polarised and polarised culture of human fallopian tube epithelial cells. *Biol Cell* **82**, 103-7.
- Killian G. J. (2004) Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 141-53.
- Kimura H., Matsuda J., Ogura A., Asano T., Naiki M. (1994) Affinity binding of hamster oviductin to spermatozoa and its influence on in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **39**, 322-7.
- Koch T., Berg R. (1985) Lehrbuch der Veterinäranatomie, Band 2: Eingeweidelehre. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Kowalski A. A., Graddy L. G., Vale-Cruz D. S., Choi I., Katzenellenbogen B. S., Simmen F. A., Simmen R. C. (2002) Molecular cloning of porcine estrogen receptor-beta complementary DNAs and developmental expression in periimplantation embryos. *Biol Reprod* **66**, 760-9.
- Kuiper G. G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-70.
- Kuiper G. G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-30.
- Kurita T., Lee K. J., Cooke P. S., Taylor J. A., Lubahn D. B., Cunha G. R. (2000) Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* **62**, 821-30.
- Leese H. J. (1988) The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* **82**, 843-56.
- Leese H. J., Tay J. I., Reischl J., Downing S. J. (2001) Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* **121**, 339-46.
- Lefebvre R., Lo M. C., Suarez S. S. (1997) Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* **56**, 1198-204.
- Leighton J., Kline I., Belkin M., Legallais F., Orr H. C. (1957) The similarity in histologic appearance of some human cancer and normal cell strains in sponge-matrix tissue culture. *Cancer Res* **17**, 359-63.

- Leitner M., Aurich J. E., Galabova G., Aurich C., Walter I. (2003) Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. *Histol Histopathol* **18**, 787-95.
- Leslie M. V., Hansen P. J. (1991) Progesterone-regulated secretion of the serpin-like proteins of the ovine and bovine uterus. *Steroids* **56**, 589-97.
- Leveille M. C., Roberts K. D., Chevalier S., Chapdelaine A., Bleau G. (1987) Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* **36**, 227-38.
- Liebich H. (2004) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Lombard L., Morgan B. B., McNutt S. H. (1950) The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle. *J Morphol* **86**, 1-23.
- Lücke S. (2005) Zyklusabhängige Veränderungen am Eileiter des Rindes und Charakterisierung boviner Eileiterepithelzellen in Suspensionskultur. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Lyons R. A., Djahanbakhch O., Mahmood T., Saridogan E., Sattar S., Sheaff M. T., Naftalin A. A., Chenoy R. (2002) Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod* **17**, 584-8.
- Mahmood T., Saridogan E., Smutna S., Habib A. M., Djahanbakhch O. (1998) The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Hum Reprod* **13**, 2991-4.
- Malayer J. R., Hansen P. J., Buhi W. C. (1988) Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool* **248**, 345-53.
- Malmi R., Soderstrom K. O. (1988) Lectin binding to rat spermatogenic cells: effects of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment. *Histochem J* **20**, 276-82.
- Martus N. S., Verhage H. G., Mavrogianis P. A., Thibodeaux J. K. (1998) Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* **113**, 323-9.
- McCauley T. C., Buhi W. C., Wu G. M., Mao J., Caamano J. N., Didion B. A., Day B. N. (2003) Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* **69**, 828-34.
- McDaniel J. W., Scalzi H., Black D. L. (1968) Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct. *J Dairy Sci* **51**, 754-61.

- Meyer H. H. D. (1994) Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen. In: F. Döcke (Ed.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Michel G. (2001) Kompendium der Embryologie der Haussäugetiere. Enke Verlag, Stuttgart.
- Michellini M., Rosellini A., Simoncini T., Papini S., Revoltella R. P. (2004) A three-dimensional organotypic culture of the human uterine exocervix for studying mucosal epithelial differentiation and migrating leukocytes. *Differentiation* **72**, 138-49.
- Miller J. G., Schultz G. A. (1987) Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* **36**, 125-9.
- Moritz K. M., Wintour E. M. (1999) Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol* **13**, 171-8.
- Mosselman S., Polman J., Dijkema R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* **392**, 49-53.
- Mowa C. N., Iwanaga T. (2000) Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol* **165**, 59-66.
- Murray M. K. (1992) Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. *Biol Reprod* **47**, 889-902.
- Nancarrow C. D., Hill J. L. (1994) Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol Int* **18**, 1105-14.
- Nayak R. K., Ellington E. F. (1977) Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am J Vet Res* **38**, 157-68.
- Nellor J. E. (1965) The leucocyte-like cells of the oviducts during the normal estrous cycle and their modification by progestin and estrogen treatment. *Anat Rec* **151**, 171-81.
- Newcomb R., Rowson L. E. (1975) Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J Reprod Fertil* **43**, 539-41.
- Nichol R., Hunter R. H., Gardner D. K., Leese H. J., Cooke G. M. (1992) Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* **96**, 699-707.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1987) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Parey Verlag, Berlin.

- Nilsson S. (1969) Electron microscopic structure of the oviduct. In: Hafez E.S.E. and Blandau R.J. (Eds.): The mammalian oviduct. Comparative Biology and Methodology., 57-83.
- Odor D. L. (1974) The question of "basal" cells in oviductal and endocervical epithelium. *Fertil Steril* **25**, 1047-62.
- Odor D. L., Augustine J. R. (1995) Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech* **32**, 13-28.
- Odor D. L., Gaddum-Rosse P., Rumery R. E. (1983) Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. *Am J Anat* **166**, 149-72.
- Oikawa T., Sendai Y., Kurata S., Yanagimachi R. (1988) A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res* **19**, 113-22.
- Oliphant G., Reynolds A. B., Smith P. F., Ross P. R., Marta J. S. (1984) Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol Reprod* **31**, 165-74.
- Ouhibi N., Menezo Y., Benet G., Nicollet B. (1989) Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* **4**, 229-35.
- Papini S., Rosellini A., Campani D., DeMatteis A., Selli C., Revoltella R. P. (2004) Selective growth of epithelial basal cells from human prostate in a three-dimensional organ culture. *Prostate* **59**, 383-92.
- Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., First N. L. (1989) Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* **41**, 683-99.
- Pauerstein C. J., Woodruff J. D. (1967) The role of the "indifferent" cell of the tubal epithelium. *Am J Obstet Gynecol* **98**, 121-5.
- Pelliniemi L. J., Saloniemi A. L. (1976) Cytological identification of sex in pig embryos at indifferent gonadal stages. *Acta Anat (Basel)* **95**, 558-64.
- Pollard J. W., Plante C., King W. A., Hansen P. J., Betteridge K. J., Suarez S. S. (1991) Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* **44**, 102-7.
- Price D., Zaijjar J. J. P. (1969) Prenatal development of the oviduct in vivo and in vitro.
- Rapisarda J. J., Mavrogianis P. A., O'Day-Bowman M. B., Fazleabas A. T., Verhage H. G. (1993) Immunological characterization and immunocytochemical localization of an oviduct-specific glycoprotein in the human. *J Clin Endocrinol Metab* **76**, 1483-8.

- Reischl J., Prella K., Schol H., Neumüller C., Einspanier R., Sinowatz F., Wolf E. (1999) Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res* **296**, 371-83.
- Rief S., Sinowatz F., Stojkovic M., Einspanier R., Wolf E., Prella K. (2002) Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* **124**, 543-56.
- Roberts G. P., Parker J. M., Symonds H. W. (1975) Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* **45**, 301-13.
- Rosenfeld C. S., Yuan X., Manikkam M., Calder M. D., Garverick H. A., Lubahn D. B. (1999) Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol Reprod* **60**, 691-7.
- Rubenstein B. B., Strauss H., Lazarus M. L., Hankin H. (1951) Sperm survival in women; motile sperm in fundus and tubes of surgical cases. *Fertil Steril* **2**, 15-9.
- Rüsse I., Sinowatz F. (2002) Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey Verlag, Berlin.
- Saji S., Jensen E. V., Nilsson S., Rylander T., Warner M., Gustafsson J. A. (2000) Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 337-42.
- Sandermann H., Jr. (1978) Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim Biophys Acta* **515**, 209-37.
- Satoh T., Abe H., Sendai Y., Iwata H., Hoshi H. (1995) Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1266**, 117-23.
- Sattar S., Abbas B., Jones L., Saridogan E., Mahmood T., Mehta J., Djahanbakhch O. (1999) Comparison of the growth patterns and morphological characteristics of mechanically and enzymatically isolated fallopian tube epithelial cells. *Cell Biol Int* **23**, 379-83.
- Schmidt M., Avery B. (1990) In vitro culture of bovine demi embryos on bovine oviduct epithelial feeder cells. *Reprod Dom Anim* **25**, 167-172.
- Shirley B., Reeder R. L. (1996) Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* **276**, 164-73.
- Sinowatz V. F., Wrobel K. H., Friess A. E. (1985) Histochemistry and cytochemistry of the mammalian epididymis. *Acta Histochem Suppl* **31**, 151-8.



- Soderstrom K. O., Malmi R., Karjalainen K. (1984) Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry* **80**, 575-9.
- Sorokin S. P. (1968) Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* **3**, 207-30.
- Steffl M., Schweiger M., Amselgruber W. M. (2004) Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle: a double-labelling immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* **121**, 239-44.
- Stephenson D. C., Hansen P. J., Newton G. R., Bazer F. W., Low B. G. (1989) Inhibition of lymphocyte proliferation by uterine fluid from the pregnant ewe. *Biol Reprod* **41**, 1063-75.
- Suarez S. S. (1998) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* **58**, 1105-7.
- Suarez S. S. (2002) Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* **37**, 140-3.
- Suarez S. S., Brockman K., Lefebvre R. (1997) Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* **56**, 447-53.
- Sun T., Lei Z. M., Rao C. V. (1997) A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* **131**, 97-108.
- Sutton R., Nancarrow C. D., Wallace A. L., Rigby N. W. (1984) Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J Reprod Fertil* **72**, 415-22.
- Takeuchi K., Maruyama I., Yamamoto S., Oki T., Nagata Y. (1991) Isolation and monolayer culture of human fallopian tube epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**, 720-4.
- Thibodeaux J. K., Myers M. W., Goodeaux L. L., Menezo Y., Roussel J. D., Broussard J. R., Godke R. A. (1992) Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. *Reprod Fertil Dev* **4**, 573-83.
- Tremblay G. B., Tremblay A., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Labrie F., Giguere V. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* **11**, 353-65.

- Ulbrich S. E., Kettler A., Einspanier R. (2003) Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**, 279-89.
- Verhage H. G., Abel J. H., Jr., Tietz W. J., Jr., Barrau M. D. (1973) Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. *Biol Reprod* **9**, 460-74.
- Verhage H. G., Bareither M. L., Jaffe R. C., Akbar M. (1979) Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat* **156**, 505-21.
- Verhage H. G., Boice M. L., Mavrogianis P., Donnelly K., Fazleabas A. T. (1989) Immunological characterization and immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the baboon (*Papio anubis*). *Endocrinology* **124**, 2464-72.
- Verhage H. G., Fazleabas A. T., Donnelly K. (1988) The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* **122**, 1639-45.
- Verhage H. G., Fazleabas A. T., Mavrogianis P. A., O'Day-Bowman M. B., Donnelly K. M., Arias E. B., Jaffe R. C. (1997) The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Hum Reprod Update* **3**, 541-52.
- Verhage H. G., Mavrogianis P. A., Boice M. L., Li W., Fazleabas A. T. (1990) Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. *Am J Anat* **187**, 81-90.
- Vermeirsch H., Van Den Broeck W., Coryn M., Simoens P. (2002) Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod Fertil Dev* **14**, 241-50.
- Wagh P. V., Lippes J. (1989) Human oviductal fluid proteins. Identification and partial purification. *Fertil Steril* **51**, 81-8.
- Walter I. (1995) Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat Rec* **243**, 347-56.
- Walter I., Bavdek S. (1997) Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrous cycle. *J Anat* **190 (Pt 2)**, 299-307.
- Walter I., Miller I. (1996) S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: in situ distribution and changes during primary cell culture. *Histochem J* **28**, 671-80.
- Wang H., Eriksson H., Sahlin L. (2000) Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* **63**, 1331-40.
- Whitworth D. J., Shaw G., Renfree M. B. (1997) Mullerian duct regression in a marsupial, the tammar wallaby. *Anat Embryol (Berl)* **196**, 39-46.

Wijayagunawardane M. P., Miyamoto A., Sato K. (1999) Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxytocin and luteinizing hormone. *Theriogenology* **52**, 791-801.

Witkowska E. (1979) Reactivity of the epithelial cells of the bovine oviduct in vitro on the exogenic gonadotropic and steroid hormones. Part I: The effect of gonadotropic and steroid hormones on the amount of lipids and activity of dehydrogenases. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* **17**, 225-38.

Yaniz J. L., Lopez-Gatius F., Santolaria P., Mullins K. J. (2000) Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* **260**, 268-78.

Zachariah N. Y., Chakmakjian Z. H. (1983) Stability of estrogen- and progesterone-receptor concentrations in human uterus tissue. *Clin Chem* **29**, 1070-2.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
abs.	Absolut
A. dest	Aqua destillata
AMH	Anti-Müller-Hormon
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BDMA	Benzyl dimethyl amine
BFPE	Bouin fixiert, in Paraffin eingebettet
Biot.	Biotin markiert
BOEC	Bovine Oviduktepithelzellen
BSA	bovines Serumalbumin
C.l.	Corpus luteum
Con A	<i>Canavalia ensiforme Agglutinin</i>
Contra	Contralateral
DAB	3,3-Diamonobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DBA	<i>Dolichus biflorus Agglutinin</i>
DDSA	Dodecenylsuccinic annhydride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Östrogen
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
FBS	fetales bovines Serum

FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HMFG	Human milk fat globule
ICH	Immunhistochemie
Ipsi	Ipsilateral
IVF	In vitro Fertilisation
IVK	In vitro Kultur
IVP	In vitro Produktion
Konz.	Konzentration
L.	Lamina
LH	Luteinisierendes Hormon
Lsg.	Lösung
min	Minuten
mRNA	messenger ribonuclein acid
MW	Mittelwert
MZK	Muskelzellkerne
N	Zellkern
NMA	Nadic methyl annhydride
OEC	Oviduktepithelzellen
OGP	Ovidukt spezifisches Glykoprotein
OT	Objektträger
P	Progesteron
P/S	Penicillin/Streptomycin

PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG	Prostaglandin
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PNA	<i>Arachis hypogaea Agglutinin</i>
PR	Progesteronrezeptor
PSA	<i>Pisum sativum Agglutinin</i>
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RCA	<i>Ricinus communis Agglutinin</i>
RNA	Ribonuclein acid
SEM	Rasterelektronenmikroskop (Scanning electron microscop)
sog.	Sogenannt
T.	Tunica
Tab.	Tabelle
TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
UEA	<i>Ulex europaeus Agglutinin</i>
U / min	Umdrehungen pro Minute
UTJ	uterotubale junction
UTMP	Uterine Milk Protein
Verd.	Verdünnung
Vol.	Volumen
WGA	<i>Triticum vulgare Agglutinin</i>

WGA succ.                      *Wheat germ Agglutinin succinyliert*

ZFR                              Zentrifugenröhrchen

### 8.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Ovidukt-spezifische Glykoproteine.....	22
Tab. 1	Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen.....	38
Tab. 2	Verwendete Lektine.....	45
Tab. 3	Histomorphologische Befunde der Ampulla am bovinen Eileiter am Tag 0. ....	47
Tab. 4	Histomorphologische Befunde des Isthmus am bovinen Eileiter am Tag 0. ....	49
Tab. 5	Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 2 .....	52
Tab. 6	Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 4 .....	55
Tab. 7	Histomorphologische Befunde am bovinen Eileiter am Tag 7 .....	59
Tab. 8	Alcianblau Färbung am bovinen Eileiter.....	72
Tab. 9	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors (ER) in der Ampulla.....	75
Tab. 10	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors (ER) im Isthmus.....	78
Tab. 11	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) in der Ampulla.....	81
Tab. 12	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR) im Isthmus.....	85
Tab. 13	Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) in der Ampulla .....	88
Tab. 14	Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins (OGP) im Isthmus .....	90
Tab. 15	Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP) in der Ampulla .....	93
Tab. 16	Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP) im Isthmus .....	95

### 8.4 Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abb. 1</b>	Experimentelle Ansätze, mit deren Hilfe die oben genannten Ziele verfolgt wurden. ....	9
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus .....	10
<b>Abb. 3</b>	Bild A, B, C, D: Ampulla (Metöstrus), HE-Färbung, Tag 0. ....	48
<b>Abb. 4</b>	Bild A, B, C, D: Isthmus, HE-Färbung, Tag 0.....	50
<b>Abb. 5</b>	Bild A, B, C: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 2 Bild D, E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 2.....	53
<b>Abb. 6</b>	Bild A, B, C: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 4 Bild D, E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 4.....	56
<b>Abb. 7</b>	Bild A, B, C, D: Ampulla des Eileiters, HE-Färbung, Tag 7 Bild E, F: Isthmus des Eileiters, HE-Färbung, Tag 7.....	60
<b>Abb. 8</b>	PAS-Reaktion in der Ampulla und im Isthmus Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D).....	67
<b>Abb. 9</b>	Goldner-Färbung, Ampulla und Isthmus am Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 7. ....	69
<b>Abb. 10</b>	Silberimprägnation nach Gomori, Ampulla, am Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D). ....	71
<b>Abb. 11</b>	Alcianblaufärbung bei pH 2, 5, Ampulla, am Tag 0 (A), Tag 2 (B), Tag 4 (C), Tag 7 (D). ....	73
<b>Abb. 12</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors in der Ampulla des bovinen Eileiters. 76	
<b>Abb. 13</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors im Isthmus des bovinen Eileiters. ....	79



<b>Abb. 14</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors in der Ampulla des bovinen Eileiters .....	82
<b>Abb. 15</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors im Isthmus des bovinen Eileiters. .	86
<b>Abb. 16</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins in der Ampulla des bovinen Eileiters. ....	89
<b>Abb. 17</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Oviductalen Glycoproteins im Isthmus des bovinen Eileiters. ....	91
<b>Abb. 18</b>	Immunhistologischer Nachweis von UTMP in der Ampulla am Tag 0. ....	92
<b>Abb. 19</b>	Immunhistologischer Nachweis von UTMP im Isthmus am Tag 0. ....	92
<b>Abb. 20</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP) in der Ampulla des bovinen Eileiters. ....	94
<b>Abb. 21</b>	Immunhistochemischer Nachweis des Uterine Milk Protein (UTMP) im Isthmus des bovinen Eileiters. ....	96
<b>Abb. 22</b>	Überblick über das Eileiterepithel mit darunter liegendem Bindegewebe der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.....	99
<b>Abb. 23</b>	Ausschnitt aus dem Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0... ..	100
<b>Abb. 24</b>	Ziliogenese in der Ampulla (Metöstrus) des Eileiters am Tag 0.....	101
<b>Abb. 25</b>	Ausschnitt aus dem Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0. ....	102
<b>Abb. 26</b>	Sekretorische Zellen in der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.....	103
<b>Abb. 27</b>	Protrusionen der sekretorischen Zellen in der Ampulla des bovinen Eileiters am Tag 0.....	104
<b>Abb. 28</b>	Epithelausschnitt aus der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.....	105
<b>Abb. 29</b>	Lymphozyt im Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 0.....	106
<b>Abb. 30</b>	Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur .....	108
<b>Abb. 31</b>	Ziliogenese im Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur. ....	109
<b>Abb. 32</b>	Ausschnitt aus dem Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur. ....	110
<b>Abb. 33</b>	Protrusionen der sekretorischen Zellen im Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur .....	111
<b>Abb. 34</b>	Sekretorische Zelle im Epithel der Ampulla (Metöstrus) des bovinen Eileiters am Tag 2 der Kultur. ....	112
<b>Abb. 35</b>	Eileiterepithel der Ampulla (Metöstrus) am Tag 2 der Kultur .....	113
<b>Abb. 36</b>	Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4.....	115
<b>Abb. 37</b>	Kernhaltige Protrusionen der sekretorischen Zellen aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur. ....	116
<b>Abb. 38</b>	Sekretorische Zellen im Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur. ....	117
<b>Abb. 39</b>	Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur. ....	118

<b>Abb. 40</b>	Ausschnitt aus dem Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur. ....	119
<b>Abb. 41</b>	Sekretorische Zellen im Epithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 4 der Kultur. ....	120
<b>Abb. 42</b>	Zilientragende Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur. ....	122
<b>Abb. 43</b>	Sekretorische und zilientragende Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur. ....	123
<b>Abb. 44</b>	Sekretorische Zellen im Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur der Kultur. ....	124
<b>Abb. 45</b>	Ausschnitt aus dem Eileiterepithel des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur. ....	125
<b>Abb. 46</b>	Basallamina des Eileiterepithels des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur. ....	126
<b>Abb. 47</b>	Bindegewebe des Eileiterepithels des bovinen Eileiters der Ampulla (Metöstrus) am Tag 7 der Kultur. ....	127
<b>Abb. 48</b>	Con A-Bindung im Isthmus am Tag 0 .....	128
<b>Abb. 49</b>	Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 0 .....	128
<b>Abb. 50</b>	Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 2 .....	129
<b>Abb. 51</b>	Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 4 .....	129
<b>Abb. 52</b>	Con A-Bindung in der Ampulla am Tag 7 .....	129
<b>Abb. 53</b>	PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	130
<b>Abb. 54</b>	PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	130
<b>Abb. 55</b>	PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	131
<b>Abb. 56</b>	PSA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	131
<b>Abb. 57</b>	UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	132
<b>Abb. 58</b>	UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	132
<b>Abb. 59</b>	UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	133
<b>Abb. 60</b>	UEA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	133
<b>Abb. 61</b>	WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	134
<b>Abb. 62</b>	WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	134
<b>Abb. 63</b>	WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	135
<b>Abb. 64</b>	WGA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	135
<b>Abb. 65</b>	WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	136
<b>Abb. 66</b>	WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	136
<b>Abb. 67</b>	WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	137
<b>Abb. 68</b>	WGAs-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	137
<b>Abb. 69</b>	WGAs-Bindung im Zelluloseschwämmchen der Eileitergewebekultur am Tag 7 .....	137
<b>Abb. 70</b>	DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	138
<b>Abb. 71</b>	DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	138

<b>Abb. 72</b>	DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	139
<b>Abb. 73</b>	DBA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	139
<b>Abb. 74</b>	RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	140
<b>Abb. 75</b>	RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	140
<b>Abb. 76</b>	RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	141
<b>Abb. 77</b>	RCA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	141
<b>Abb. 78</b>	PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 0 .....	142
<b>Abb. 79</b>	PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 2 .....	142
<b>Abb. 80</b>	PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 4 .....	143
<b>Abb. 81</b>	PNA-Bindung im bovinen Eileiter am Tag 7 .....	143

## 8.5 Verzeichnis der Graphiken

Graphik 1: Die Höhe des Epithels in $\mu\text{m}$ in der Ampulla im Kulturverlauf.....	63
Graphik 2: Epithelhöhe in $\mu\text{m}$ im Isthmus während der Kultur.....	64
Graphik 3: Epithelhöhe im Kulturverlauf. Vergleich Ampulla und Isthmus .....	65
Graphik 4: ER $\alpha$ -Expression in der Ampulla des bovinen Eileiters .....	77
Graphik 5: PR-Expression in der Ampulla des bovinen Eileiters .....	83
Graphik 6: ER $\alpha$ - und PR-immunpositive Zellen in der Ampulla .....	84

## 9 Anhang

### 9.1 Lösungen

#### Fixierung für die Lichtmikroskopie:

• Bouin-Lösung:	Pikrinsäure (gesättigt und filtriert)	500 ml
	Paraformaldehyd 35%	500 ml
	Eisessig	100 ml

#### Lösungen für die lichtmikroskopischen Färbungen:

##### HE-Färbung:

• Eosin:	Stammlösung	Eosin	2 g
		Aqua dest	198 ml

Einige Tropfen Formol zur Haltbarkeit

	Verdünnung:	Aqua dest.	600 ml
		Eosin-Stammlösung	60 ml
		Eisessig	8 Tropfen
• Hämalan:		Aqua dest.	2000 ml
		Hämatoxylin	2 g
		Natriumjodat	100 g
		Kalialan (chemisch rein)	100 g
		Chloralhydrat	100 g
		Kristalline Zitronensäure	2 g

(Alle Substanzen Firma Merck, Darmstadt)

Periodic-Acid-Schiff-Reaktion:

- wässrige Lösung:

Perjodsäure	Perjodsäure	0,5 g
	Aqua dest.	100 ml

- Fuchsin-schwefelige Säure (Schiff'sches Reagenz)

SO <sub>2</sub> -haltiges Spül- flüssigkeit:	Leitungswasser	200 ml
---	----------------	--------

	Kaliumpyrosulfid 10%	10 ml
--	----------------------	-------

	n-Salzsäure	10 ml
--	-------------	-------

- n-Salzsäure: 1 normale Salzsäure

	Aqua dest	ad 1000 ml
--	-----------	------------

- Hämalun (siehe oben)

Trichromfärbung nach Masson und Goldner:

- Eisenhämatoxylin nach Weigert: (Lösungen A und B im Verhältnis 1:1)

Lösung A)	Hämatoxylin	1 g
-----------	-------------	-----

	Ethanol 96%	100 ml
--	-------------	--------

Lösung B)	Eisen-3-Chlorid	1,16 g
-----------	-----------------	--------

	Aqua dest.	98 ml
--	------------	-------

- Azophloxin:
- |  |            |       |
|--|------------|-------|
|  | Azophloxin | 0,5 g |
|--|------------|-------|

	Aqua dest.	100 ml
--	------------	--------

	Eisessig	0,2 ml
--	----------	--------

Phosphormolybdän- säure-Orange:	Phosphorwolframsäure	3-5 g
	Aqua dest.	100 ml
	Orange G	2 g
• Lichtgrün:	Lichtgrün	0,1-0,2 g
	Aqua dest	100 ml
	Eisessig	0,2 ml
• Essigsäure 1%		

Alcianblau:

• Essigsäure 3%		
• Kernechtrot		
• Alcianblau 8GX	Alcianblau 8GX	1 g
	Essigsäure 3%	100 ml

pH-Wert auf 1 bzw. 2,5 einstellen, Lösung filtrieren und einen kleinen Thymolkristall zusetzen.

Silberimprägnation nach Gomori:

## • Ammoniakalische Silberlösung:

Zu 10 ml einer 10% Silbernitratlösung ( $\text{AgNO}_3$ ) setzt man 2 ml 10% Kalilauge ( $\text{KOH}$ ) zu. Es entsteht ein brauner Niederschlag. Der Niederschlag wird aufgelöst durch tropfenweises Zufügen von Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). Es wird tropfenweise  $\text{AgNO}_3$  zugegeben bis die dabei entstehenden Schlieren nur noch langsam verschwinden. Die Lösung ist nun klar und braun. Mit A. dest wird auf das doppelte Volumen aufgefüllt.

• 0,5% Kaliumpermanganatlösung ( $\text{KMnO}_4$ )• 2% Kaliumdisulfitlösung ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )• 2% Eisenammoniumsulfatlösung (Eisenhämalaun,  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ )

## • Formol-Leitungswasser (1:9)

• 0,1% Goldchlorid ( $\text{AuHCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )• 1% Natriumthiosulfatlösung ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )Lösungen für die Elektronenmikroskopie:

## A) Fixierungslösung nach Karnovsky

## • 10% Paraformaldehyd

Paraformaldehyd

10 g

## Lösung:

Aqua dest.

ad 100 ml

NaOH, 1M

bis zu 6 Trpf.

## • Karnovsky-

10% Paraformaldehyd-

20 ml

## Stammlösung:

lösung

Cacodylat-Puffer, 0,2M

50 ml

Kalziumchlorid, wasserfrei

0,05 g

## Karnovskygebrauch-

Karnovsky Stammlsg

10 ml

## lösung:

## B) Kontrastierungslösung:

## • Osmiumtetroxid-

Glutaraldehyd, 25%	1,37 ml
--------------------	---------

Osmiumtetroxid, 4%	2 ml
--------------------	------

Lösung, 2%:

Cacodylat-Puffer, 0,1 M	2 ml
-------------------------	------

## • Kaliumferrocyanid-

Kaliumferrocyanid	0,3 g
-------------------	-------

Lösung, 3%:

Cacodylat-Puffer, 0,1 M	ad 10 ml
-------------------------	----------

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylat-Puffer, 0,1 M:

Osmiumtetroxid-	4 ml
-----------------	------

Lösung, 2%

Kaliumferrocyanid-	4 ml
--------------------	------

Lösung, 3%

## C) Cacodylat-Puffer:

## • Lösung A:

$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$	8,56 g
---	--------

Aqua dest.	ad 200 ml
------------	-----------

## • Lösung B:

HCl 0,2 M	
-----------	--

Cacodylat-Puffer 0,2 M,

pH 7,2:

Lösung A	50 ml
----------	-------

Lösung B	4,2 ml
----------	--------

Aqua dest.	ad 100 ml
------------	-----------

Cacodylat-Puffer 0,1 M,

pH 7,2:

Cacodylat-Puffer 0,2 M	50 ml
------------------------	-------



	Aqua dest.	50 ml
D) Epon (Polysciences, Eppelheim)		
	• Poly/bed 812	16 ml
	• DDSA	10 ml
	• NMA	9 ml
	•BDMA	0,3 - 0,5 ml
E) Propylenoxid (Polysciences, Eppelheim)		
F) Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (Merk, Darmstadt)		
	• Bleinitrat	1,33 g
	• Na-Citrat	1,76 g
	• H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> -frei	30 ml
erst 1 min stark schütteln, dann 30 min in 50 ml Flasche schütteln		
	• Na OH, 1 M	8 ml
dann mit A. dest auf 50 ml auffüllen, mischen bis alles gelöst ist.		
G) Uranylacetat (Plano, Marburg)		

Pufferlösungen:

- PBS-Puffer (Phosphat buffered saline):

NaCl: 42,5 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6,35 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,95 g

alles lösen in 5 Liter A. dest, dann pH 7,4 - 7,6 einstellen.

- Zitratpuffer:

Stammlsg A:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt) 21,01 g

Lösen in 1 Liter A. dest

Stammlsg B:  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  29,41 g  
(Merck, Darmstadt)

Lösen in 1 Liter A. dest

Gebrauchslösung: 9ml Lösung A und 41ml Lösung B ad 500 ml

• TRIS-Puffer: NaCl (Merck, Darmstadt) 43,9 g

TRIZMA-Hydrochlorid 34,25 g  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

TRIZMA-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) 4,5 g

alles lösen in 5 Liter A. dest, dann pH 7,4 - 7,6 einstellen.

Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen (zu 4.2) :

• DAB-Herstellung:	PBS-Puffer	5 ml
	Stammlösung: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	15 µl
	DAB-Lösung: A. dest.	60 ml
	DAB-Tabletten	6 Stück

Von der Stammlösung 0,4 ml zur DAB-Lösung hinzufügen, gut mischen und filtrieren.

Medien für die Zellkultur:

• Transport- und Spüllösung:	PBS	500 ml
	Penicillin/ Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)	5 ml
• Isoliermedium:	DMEM (Sigma, Deisenhofen)	

(Earle`s Salts, L-Glutamine,  
NaHCO<sub>3</sub>)

• Anzuchtmedium: DMEM

+ 10% FBS (GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

bzw. + 10% OCS (= oestrus cow serum)

+ 1% P/S (= Penicillin/Streptomycin)

Fixierungslösungen für die Zellkultur:

- Bouin-Lösung
  - gesättigte Pikrinsäure 15 ml
  - Paraformalin 35% 5 ml
  - Eisessig 1 ml
  
- Formaldehyd 37%, PBS  
gepuffert
  - Formaldehyd, 37% 100 ml
  - PBS-Puffer (siehe oben) 900 ml
  
- Methanol-Aceton (1:1), eiskalt

## 10 Lebenslauf

<u>Persönliche Daten</u>	
Name	Svetla Kotov, geb. Zacharieva
Geburtsdatum	14.03.1976
Geburtsort	Sofia
Familienstand	Verheiratet
Eltern	Krassimira Kjutschukova, geb. Simeonova Christo Kjutschukov
Geschwister	Christina Zacharieva
<u>Schul- und Berufsausbildung</u>	
09/1990 – 06/1995	Deutschsprachiges Gymnasium Sofia Abschluss Allgemeine Hochschulreife
<u>Hochschulstudium</u>	
08/1995 – 07/1996	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Sofia
10/1996 – 09/2004	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2004	Bestehen des Staatsexamen
09/2004	Approbation

## 11 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die jederzeit gewährte, freundliche und engagierte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Habermann für seinen fachkundigen Rat und die stets geduldige Hilfe bei Problemen der Daten und Textverarbeitung.

Frau C. Neumüller danke ich für die jederzeit freundliche und hervorragende Unterstützung bei der Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ferner gilt mein Dank Frau Dr. Kenngott und Frau Dr. Schick für die Korrekturen, ihren fachkundigen Rat und die stets gewährte Hilfe bei Problemen aller Art.

Frau Kazior danke ich für den eifrigen Zuspruch und ihre Hilfe in allen organisatorischen Angelegenheiten.

Bei labortechnischen Arbeiten unterstützten mich Frau Zahn und Frau Rußmeier in dankenswerter und zuverlässiger Weise.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Schuster für die freundliche Einarbeitung und Betreuung und Beistand nicht nur in der Zellkultur bedanken.

Für das Lesen der Korrekturen danke ich Frau Dr. Susane Alteneder, Frau Wiebke Scholz und Frau Diljana Todorova.

Ein Dank aus tiefsten Herzen geht an meinem Mann Alexander Kotov, weil er mich die ganze Zeit während dieser Arbeit ertragen hat, obwohl das nicht immer leicht war. Darüber hinaus danke ich ihm sehr für die großartige Unterstützung bei diversen Hard- und Softwareproblemen und bei der fotografischen Dokumentation der Arbeit.

Endlich habe ich hier die Möglichkeit meinen Eltern zu sagen, wie sehr ich Ihnen für die jahrelange, uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Lebensweg danke. Trotz großer Entfernung waren sie auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immer für mich da. Ganz be-

sonders möchte ich auch meiner Schwester und Bojan für die mir gewährte Unterstützung in sämtlichen Lebensbereichen danken.

Meinem kleinen Adrian bin ich dankbar für seine unendliche Genügsamkeit und Geduld während dieser ganzen Zeit. Der kleinen Norah danke ich, dass sie da ist und für ihr bezauberndes Lächeln.